



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Laurence GARRIC

Le vendredi 11 octobre 2013

Titre :

Rôle de la voie Nodal et du facteur de transcription pitx2c dans la mise en place
des asymétries neurales dans l'épithalamus du poisson zèbre

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Gènes, cellules et développement

Unité de recherche :

Centre de Biologie du Développement

Directeur(s) de Thèse :

Drs Patrick BLADER et Pascale DUFOURCQ

Rapporteurs :

Dr. Valérie CASTELLANI, Dr. Virgine LECAUDEY et Dr. Thierry LEPAGE

Autre(s) membre(s) du jury :

Pr Cathy SOULA (Présidente du jury)

Dr Patrick BLADER

Dr Pascale DUFOURCQ

Table des matières

INTRODUCTION	5
I) L'ASYMETRIE DROITE GAUCHE DANS LE REGNE ANIMAL	7
I.1. Phylogénie.....	7
I.2. Mise en place de l'asymétrie gauche-droite chez les vertébrés	11
I.2.1. Modèle du flux ionique	11
I.2.2. Modèle du nœud cilié	15
I.3. Mise en place de l'asymétrie viscérale	19
I.3.1. Rôle de la voie Nodal.....	19
I.3.1.a. Propagation de l'information du nœud au mésoderme latéral	21
I.3.1.b. Mise en place de l'asymétrie viscérale : implication de <i>pitx2</i> , gène cible de Nodal	27
I.3.2. Rôle de la voie de signalisation Shh	35
I.3.3. Rôle de la voie de signalisation FGF	37
I.3.4. Rôle de la voie de signalisation BMP.....	41
I.4. L'asymétrie gauche-droite neurale : mise en place et comportements latéralisés	45
I.4.1. Les asymétries neurales	45
I.4.1.a Influence des gènes : Asymétrie du système sensoriel de <i>Caenorhabditis elegans</i>	45
I.4.1.b. Influence de l'environnement : Latéralisation du système visuel chez les oiseaux.....	49
I.4.1.c. Influence du genre sur l'asymétrie	51
I.4.2. Asymétries neurales latéralisées : avantage ou inconvénient ?	53
II) L'ASYMETRIE GAUCHE DROITE DE L'EPITHALAMUS DU POISSON ZEBRE.....	59
II.1. L'épithalamus	59
II.2. Rupture de la symétrie et mise en place de la première asymétrie.....	61
II.2.1. Nodal : premier marqueur de l'asymétrie épithalamique	61
II.2.2. Rôle de la voie Wnt	65
II.3. Taille et migration de la glande parapinéale.....	65
II.3.1. Rôle de la voie Fgf et du facteur de transcription <i>tbx2b</i>	67
II.3.2. Rôle de la voie Nodal	71
II.4. Identité & asymétries habénulaires.....	71
II.4.1. Influence de la parapinéale sur l'acquisition des identités	73
II.4.2. Neurogenèse des habenules.....	75
II.4.3 Acquisition de l'identité neurale et rôle de la Voie Notch/Delta	79

II.4.3. Rôle du réticulum endoplasmique	81
II.4.4. Influence de signaux environnementaux	81
II.5. Connectivité & asymétrie des projections axonales	85
II.5.1. Asymétrie des projections axonales.....	85
II.5.2. Neuropiles habénulaires	89
II.5.3. Connexions afférentes.....	89
II.6. Fonctions de l'habenulae et comportements latéralisés.....	91
II.6.1. Fonctions des habenulae.....	91
II.6.2. Comportement latéralisés.....	93
CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	97
RESULTATS	99
I) EXPRESSION DE PITX2C.....	101
II) IMPLICATION DE <i>PITX2C</i> DANS LA NEUROGENESE SYMETRIQUE DES HABENULAE	103
II.1. Pitx2c est nécessaire à la neurogenèse asymétrique des habenulae.....	103
II.2. Pitx2c agit de manière cellulaire autonome dans les neurones de l'habenulae.....	105
II.3. Pitx2c n'influe pas sur la latéralité de la parapinéale.....	111
II.4. Action de <i>pitx2c</i> sur les projections axonales habenulo-interpédonculaire.....	111
II.5. Gènes cibles de <i>pitx2c</i>.....	113
III) PITX2C AGIT SUR L'IDENTITE HABENULAIRE EN REGULANT LA TAILLE DE LA PARAPINEALE.	117
III.1. Résumé de l'article :	117
III.2. <i>pitx2c</i> ensures habenulae asymmetry by retriecting parapineal size	173
III. 2. Résultats complémentaires.....	149
III.2.1. La surexpression de <i>pitx2c</i> ne restreint pas la taille de la parapinéale.....	149
III.2.2. <i>pitx2c</i> et <i>tbx2b</i> contrôlent indépendamment la taille de la glande parapinéale.....	149
III.2.3. <i>pitx2c</i> contribue à la migration de la parapinéale.....	152
DISCUSSION.....	157
I) PITX2C, FACTEUR DE TRANSCRIPTION RELAIS ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION NODAL ET L'ASYMETRIE DE NEUROGENESE DES HABENULAE	159
II) PITX2C, ACTEUR INSOUÇONNE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES DE LA PARAPINEALE & DE L'ACQUISITION DES IDENTITES DES NEURONES HABENULAIRES.....	173
CONCLUSION	185
MATERIEL ET METHODES	189
ANNEXES.....	299
BIBLIOGRAPHIE.....	210

INTRODUCTION

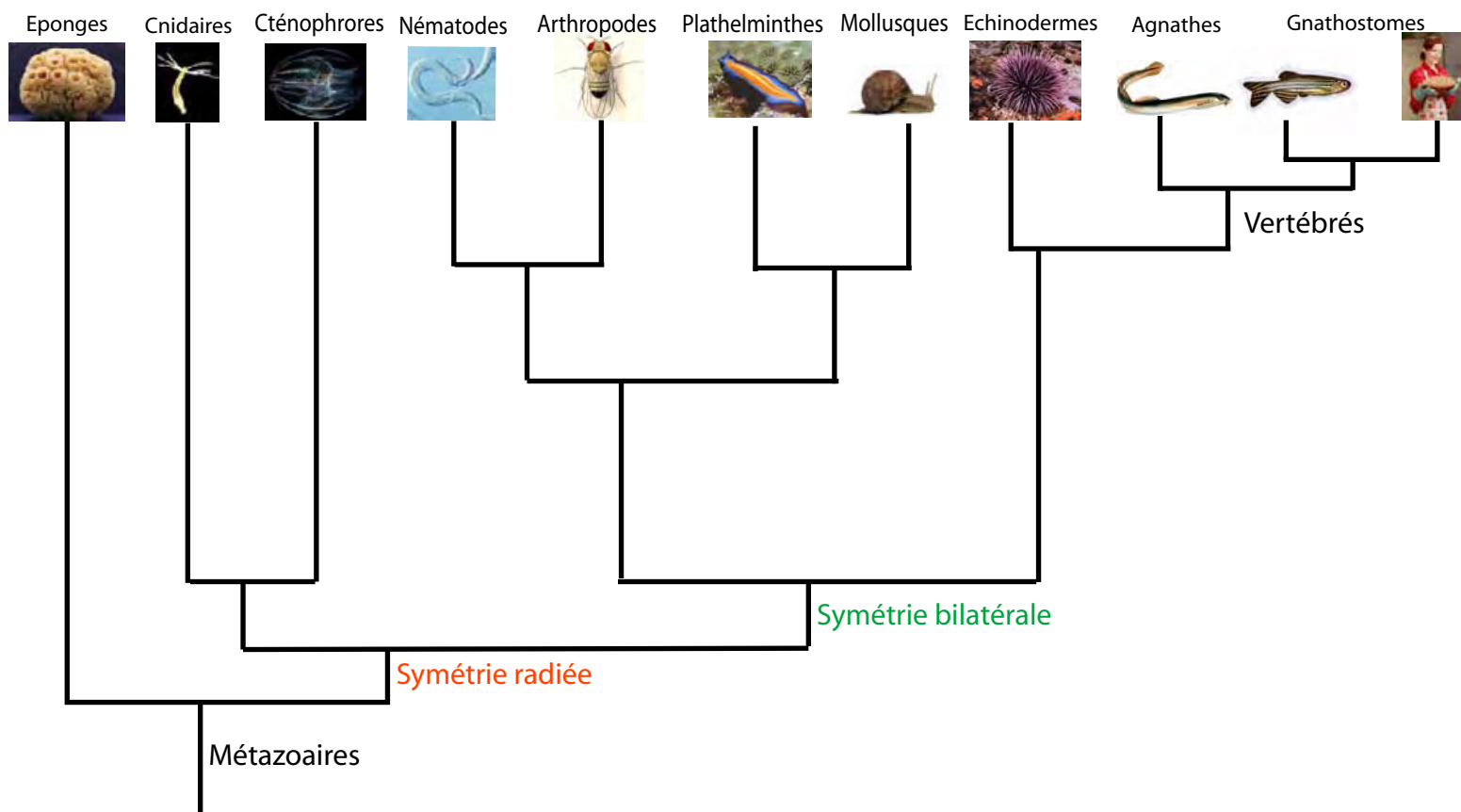


Figure 1 : Arbre phylogénétique du règne animal.

Le premier axe de symétrie apparaît à l'embranchement divergeant de celui des éponges où aucun plan d'organisation n'est observé. La première forme d'organisation est une symétrie radiée que l'on retrouve, par exemple, chez les cnidaires. La symétrie bilatérale apparaît chez les bilatériens qui comprend nématodes, arthropodes, plathelminthes, mollusques, échinodermes, agnathes et gnathostomes. Cette dernière classe inclue l'homme.

D) L'ASYMETRIE DROITE GAUCHE DANS LE REGNE ANIMAL

I.1. Phylogénie

La phylogénie distingue trois grands groupes parmi les métazoaires selon leurs plans d'organisation. Premièrement, les éponges se caractérisent par l'absence d'organisation autour d'un axe. Deuxièmement, le groupe des radiés dont la structure s'organise autour d'un axe oral-aboral qui passe par la bouche et par le centre de la face opposée. On parle alors de symétrie radiaire ou axiale. Enfin, les bilatériens qui sont organisés selon trois axes : l'axe dorso-ventral, l'axe antéro-postérieur et l'axe gauche-droite (Figure 1).

L'embranchement des bilatériens (anciennement appelés triploblatiques à cause de l'apparition du mésoderme, troisième feuillet embryonnaire) se caractérise, comme leur nom le laisse présager, par une symétrie bilatérale (à l'exception des échinodermes) organisée grâce à l'apparition concomitante des axes dorso-ventral et gauche-droite. Pour la plupart des bilatériens, c'est avant même la fécondation que leur polarité va se déterminer. La polarité végétatif-animal sera la première indication spatiale et va se définir lors de l'ovogenèse. Le pôle animal est défini par la position du site d'expulsion du premier globule polaire. Le pôle végétatif est situé à l'opposé du pôle animal. Cette première polarité est un prérequis pour la mise en place des autres axes chez les bilatériens.

L'axe antéro-postérieur ou rostro-caudal, préfiguré chez les radiés par le pôle oral-aboral des radiés suit la position de la cavité digestive. Il passe par l'orifice oral et suit globalement le trajet du tube digestif qui possède deux orifices.

A partir de l'embranchement des bilatériens, on peut décrire deux autres axes. Le premier est l'axe dorso-ventral, défini par rapport à la position de la bouche qui se trouve en ventral. Son existence va permettre de définir d'autres classes phylogénétiques en fonction de la position du tube neural par rapport à cet axe dorso-ventral. Les arthropodes, dont la chaîne ganglionnaire neurale se trouve en ventral, appartiennent à la classe des hyponeuriens alors que les chordés dont le tube neural se trouve en dorsal appartiennent à la classe des épineuriens.

Le dernier axe présent chez les bilatériens est l'axe gauche-droite et est caractéristique de cet embranchement. Il est grandement conditionné par l'existence des deux autres axes

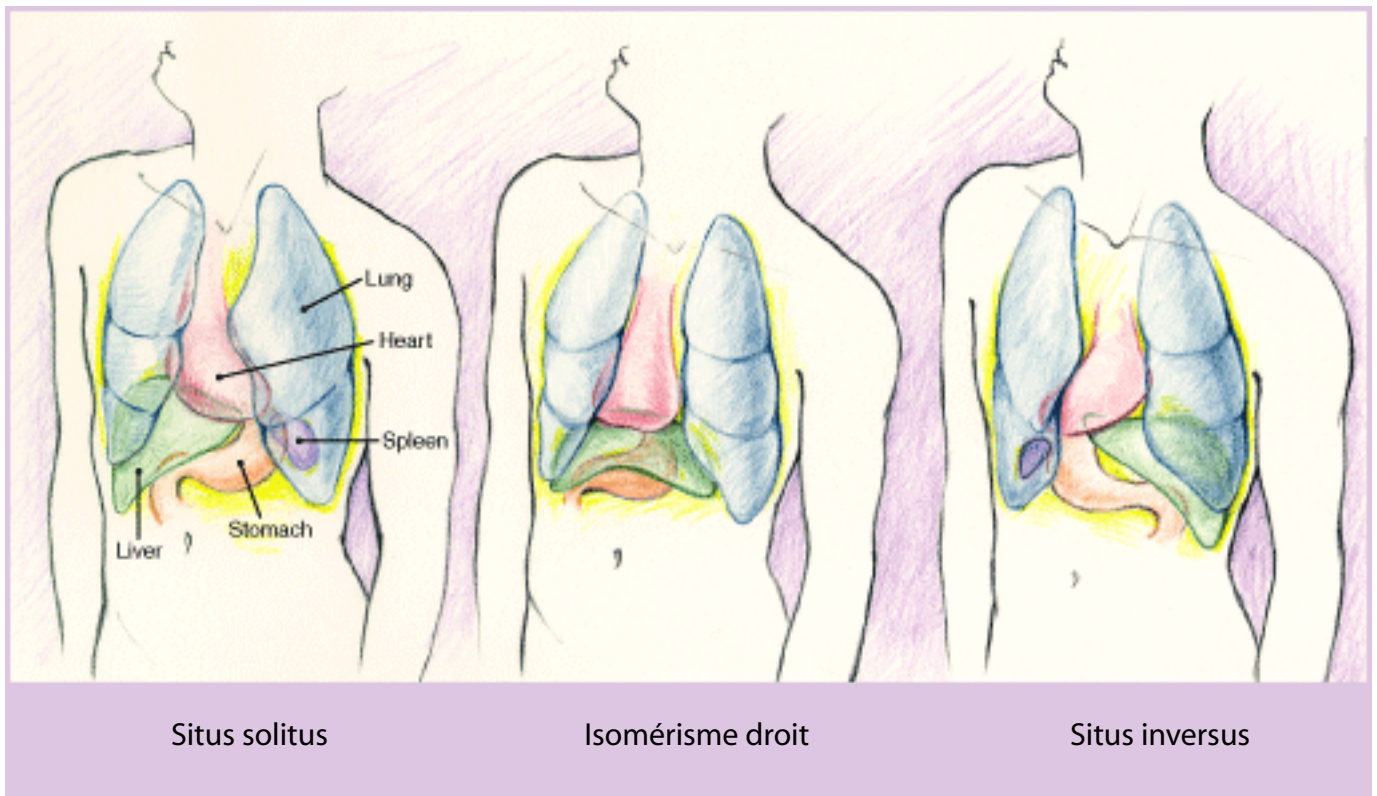


Figure 2 : Représentation schématique des différentes configurations possibles des organes internes. Le *situs solitus* est l'arrangement retrouvé dans la grande majorité de la population : le foie est à droite, l'estomac, le coeur et la rate à gauche. Les organes pairs comme le poumon présentent des différences : le poumon gauche possède deux lobes, le droit en possède trois. En cas d'isomérisme droit, un ou plusieurs organes sont symétriques : ici, les poumons ont chacun trois lobes et le coeur est symétrique. Le *situs inversus* est l'image en miroir du *situs solitus*. Cette situation complètement viable et est retrouvée dans une naissance sur 6000.

présents chez les bilatériens. L'existence de cet axe n'est révélée que par la présence d'asymétries entre côtés gauche et droit. La symétrie externe et l'asymétrie viscérale interne sont retrouvées chez un grand nombre de bilatériens et de façon transitoire chez la larve des échinodermes comme chez la larve nageuse pluteus de l'oursin. En effet, la larve possède les trois axes caractéristiques des bilatériens mais en perdra deux durant la métamorphose au profit d'une symétrie radiée.

Les raisons du maintien d'une symétrie externe restent floues mais des hypothèses ont été avancées : la symétrie extérieure permettrait à un individu d'être plus attractif, car elle reflète la qualité de son patrimoine génétique et il a ainsi plus de chance de se reproduire (*good genes hypothesis*) (Wade, 2010). On parle alors de symétrie fluctuante, c'est à dire une propriété intrinsèque de chaque génome à s'adapter aux contraintes environnementales donnant un reflet de la qualité du génome de chaque individu. Mais cette asymétrie d'apparence ne semble pas transmissible génétiquement alors que l'asymétrie dite directionnelle qui régit la position de nos organes l'est incontestablement.

On peut définir plusieurs types d'asymétries gauche-droite : premièrement, l'**enroulement** d'un organe comme les intestins ou l'enroulement de la coquille des escargots qui peut être dextre ou senestre. La proportion d'enroulement vers la droite ou vers la gauche des coquilles est fortement biaisée au sein d'une population mettant en exergue la propension de l'évolution à rendre robustes des mécanismes stéréotypés contrôlant la latéralité de l'enroulement. Le deuxième type d'asymétrie gauche-droite est l'**unilatéralité** avec comme l'exemple flagrant la position d'organes uniques comme le cœur situé à gauche ou le foie à droite. Enfin, on distingue la **bilatéralité asymétrique** comme celle des poumons, organe pair présent à gauche et à droite mais dont le nombre de lobes diffère.

L'organisation des organes interne de l'homme est fixe dans la population et est appelée *situs solitus*. Cependant, des défauts dans la position des organes peuvent survenir (Figure 2). Dans certains cas rares, la polarité gauche droite est totalement inversée et aboutit à un *situs inversus totalis* (1 individu sur 6000 chez l'humain) c'est-à-dire l'inversion en miroir de la position de tous les organes internes. Cette inversion ne pose aucun problème pour la vie des individus (Casey and Hackett, 2000; Peeters and Devriendt, 2006). Dans les cas où l'arrangement des organes les uns par rapport aux autres diffère du schéma classique, on parle d'hétérotaxies. Parmi les hétérotaxies, on distingue d'une part l'inversion d'un seul organe appelé *situs ambiguus* (1 naissance sur 10000 chez l'homme) qui peut être cliniquement silencieux et d'autre part la symétrisation en miroir d'un ou plusieurs organes internes pairs ou impairs appelée isomérismes. Dans ce dernier cas, la perte d'asymétrie se

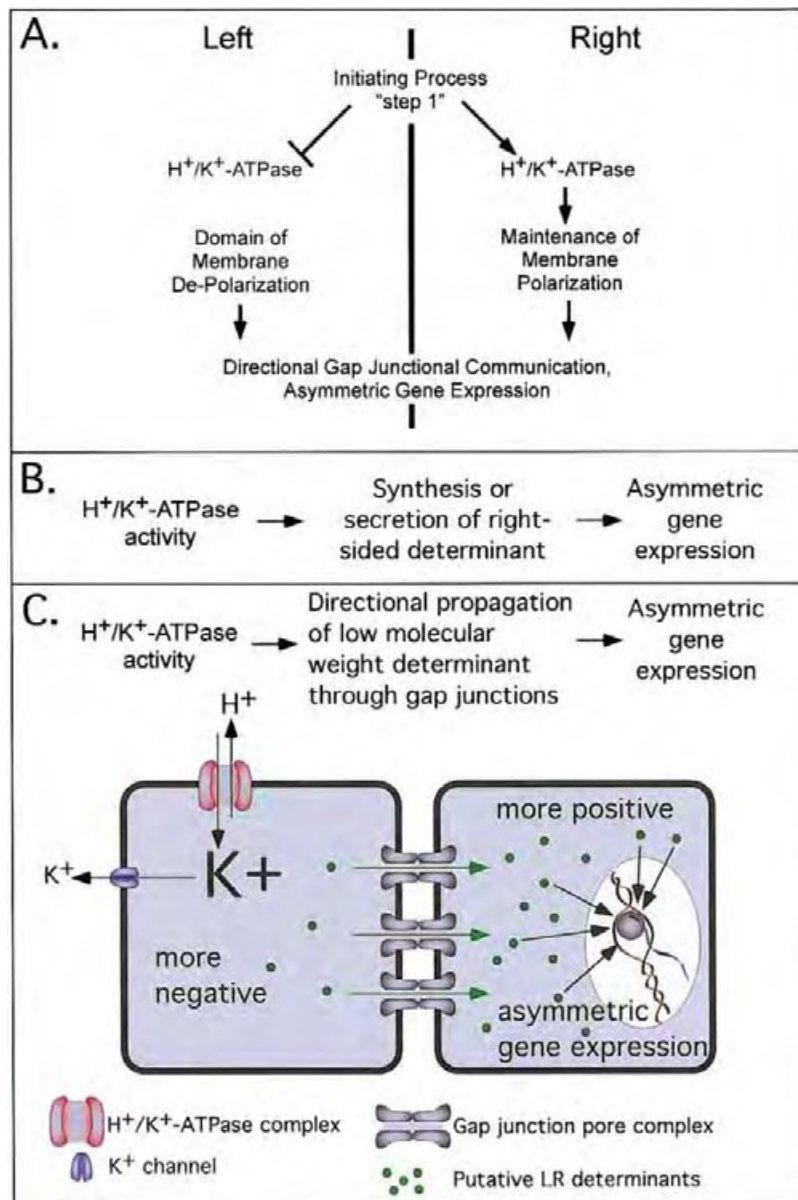


Figure 3 : Implication de la pompe ATPase H^+/K^+ dans l'asymétrie gauche-droite précoce.

A) L'activité ATPase H^+/K^+ se situe à droite chez l'embryon de xénope ou de poulet. La rupture de la symétrie initiale est hypothétiquement due à la répartition asymétrique des ARNm.

B) La fonction de la pompe ATPase H^+/K^+ pourrait réguler la sécrétion de déterminants droits qui induisent l'expression asymétrique de gènes.

C) L'ATPase H^+/K^+ pourrait promouvoir la propagation de déterminants de faible poids moléculaire entre les cellules pour créer un déséquilibre. La propagation unidirectionnelle pourrait reposer sur l'électrophorèse de molécules chargées passant par des jonctions communicantes. Cette asymétrie de charge pourrait déclencher l'asymétrie de l'expression des gènes.

(D'après Levin et al., 2002)

traduit par la duplication en miroir du côté droit ou gauche et ces malformations sont sévères et létales. Dans les cas d'isomérisme droit par exemple, les poumons ont trois lobes et le cœur est symétrique droit tout en restant impair.

La mise en place de cet axe arrive en dernier mais est essentielle au fonctionnement des organismes. Sa mise en place résulte d'une étape primordiale : la rupture de la symétrie initiale.

I.2. Mise en place de l'asymétrie gauche-droite chez les vertébrés

La mise en place de l'axe gauche-droite va donc dépendre d'une asymétrie première de laquelle va découler toutes les autres par propagation du signal initial. Au cours des années, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la rupture de la symétrie. Les mécanismes à son origine ont été décrits chez les modèles vertébrés.

I.2.1. Modèle du flux ionique

Les jonctions communicantes ont été les premières candidates pouvant être à l'origine du mécanisme permettant la rupture de la symétrie. En effet, certains patients atteints d'hétérotaxie étaient porteurs d'une mutation sur la Connexine 43, composant des jonctions communicantes. Il s'avère également que, chez la grenouille, les jonctions communicantes sont réparties asymétriquement dans les blastomères et que leur blocage par injection d'une forme dominant négatif de la connexine entraîne l'hétérotaxie et la randomisation (orientation aléatoire de la latéralité de l'asymétrie) de l'expression de Xnr-1 (Xenopus nodal related-1). Les jonctions communicantes permettent donc l'accumulation de molécules d'un seul côté de la ligne médiane permettant d'induire l'expression unilatérale de gènes. Le flux créé par les jonctions communicantes doit donc être unilatéral et actif, donc consommateur d'énergie. Une différence de voltage pourrait générer une force suffisante pour créer ce flux.

Un crible pharmacologique chez le xénope (Levin et al., 2002) a permis de mettre en évidence l'implication des pompes ATPase H^+/K^+ dans la rupture de la symétrie gauche-droite initiale, effet qui a ensuite été confirmé chez le modèle poulet. L'utilisation de composés pharmacologiques inhibiteurs de l'activité des ATPases H^+/K^+ , tels que l'oméprazole ou le lansoprazole, induit une perturbation de l'asymétrie chez plus de la moitié

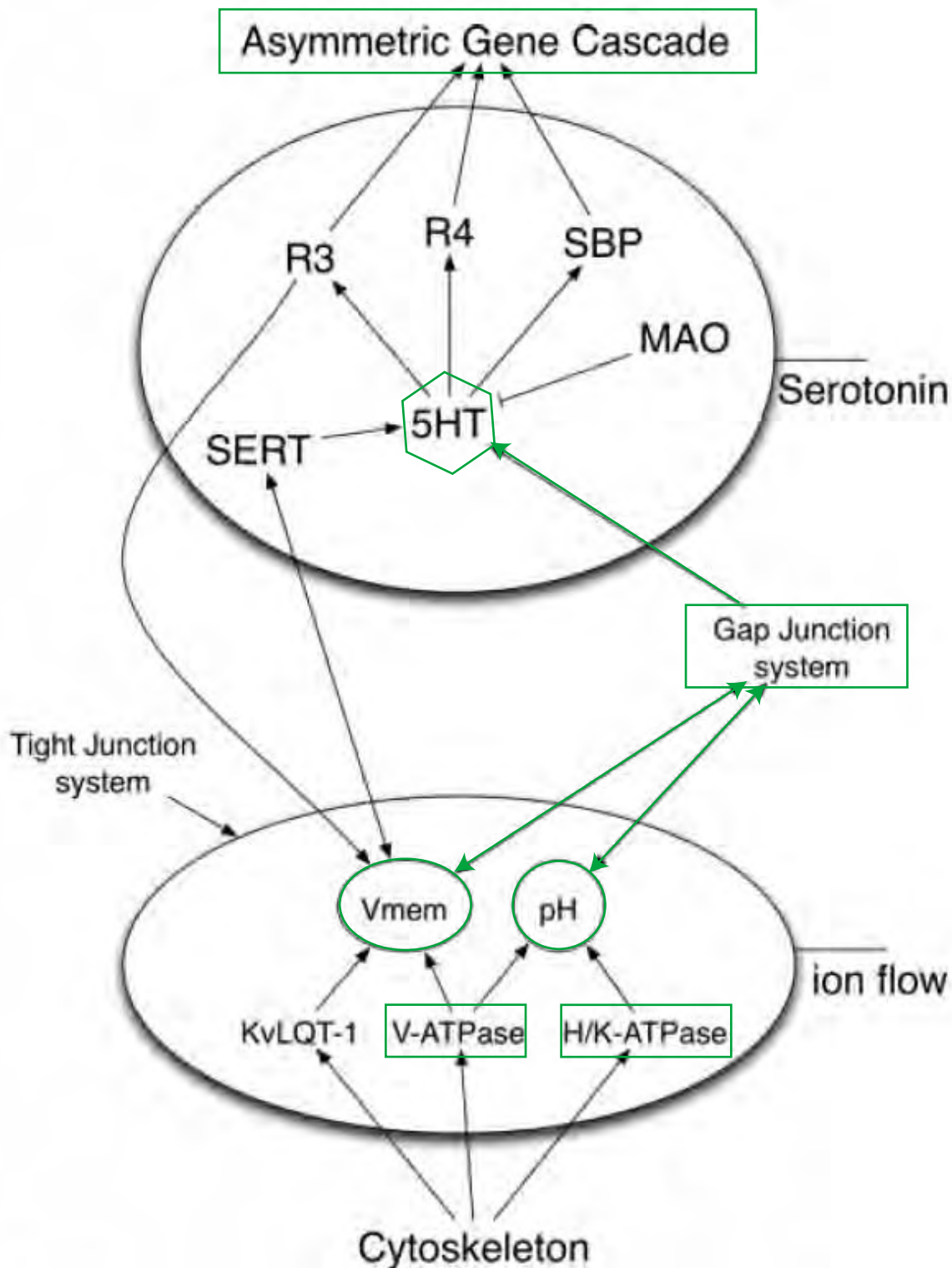


Figure 4 : Les pompes ioniques V-ATPase et H/K-ATPase sont à l'origine d'un changement de potentiel membranaire (Vmem) ainsi que d'un changement de PH qui permettrait le passage de la sérotonine (5HT). Via ces récepteurs R3 et R4, la sérotonine va ensuite initier l'activation de gènes de façon asymétrique. (Levin, 2006)

des individus traités. Parmi les hétérotaxies induites, les *situs ambiguus* sont plus fréquents que les cas d'isomérisme ou de *situs inversus*. Au niveau moléculaire, l'inhibition de l'activité de ces pompes a deux conséquences : elle peut causer soit la symétrisation de l'expression de gènes normalement exprimés asymétriquement dans le mésoderme latéral (comme *nodal* ou *lefty*), soit l'inhibition de l'expression de gènes (comme pour *fgf8*).

Le même type de crible a mis en évidence l'implication d'une seconde pompe ionique, la H^+ -V-ATPase (Adams et al., 2006). Le blocage de l'activité de cette pompe par traitement pharmacologique ou par injection d'une forme dominant négatif induit une forte proportion d'hétérotaxie dans la population traitée.

Ces deux types de pompes ioniques, qui créent une action biophysique nécessaire à la mise en place de l'asymétrie, sont elles-mêmes localisées asymétriquement très tôt dans le développement chez le xénope. L'ARNm ATPase H^+/K^+ est asymétriquement localisé dès la première division de l'embryon. Des analyses immunocytochimiques ont montré que l'ATPase H^+ -V est exprimée plus fortement dans un des deux premiers blastomères.

Indépendamment de la manipulation des pompes ioniques, l'acidification du pH de l'environnement de l'embryon ou le changement du pH des cellules par surexpression de l'échangeur Na^+/H^+ causent une augmentation des cas d'hétérotaxie. Adams et al. proposent que l'activité de ces deux pompes provoque une dépolarisation de la membrane suffisante pour créer une force unidirectionnelle permettant de concentrer les molécules signalisantes seulement d'un côté. Par ailleurs, ils proposent également que l'activité asymétrique des pompes permette d'activer les morphogènes tout aussi asymétriquement (Figure 3).

Finalement, les pompes créent un premier déséquilibre en permettant l'accumulation d'un déterminant pour imposer une première différence gauche-droite. Cette différence engendrée par les jonctions communicantes doit impliquer une molécule soluble dans l'eau et de taille suffisamment petite pour passer par ces jonctions. La sérotonine remplit tous ces critères et son implication dans la détermination gauche-droite via ces récepteurs R3 et R4 a été montrée par Fukumoto (Fukumoto et al., 2005). L'inhibition de ces récepteurs agit sur la latéralité de l'expression de gènes normalement exprimés asymétriquement. De plus, l'expression ectopique de sérotonine provoque la randomisation de l'asymétrie (Figure 4) (Vandenberg et al.).

La mise en place de l'asymétrie gauche-droite dépend donc de ce flux biophysique présent précocement. Ce mécanisme a surtout été décrit chez le xénope. Mais l'implication des pompes H^+/K^+ ATPases a été également mise en évidence chez l'oursin : chez cet animal modèle, l'asymétrie droite gauche est seulement présente au stade larvaire et l'ajout

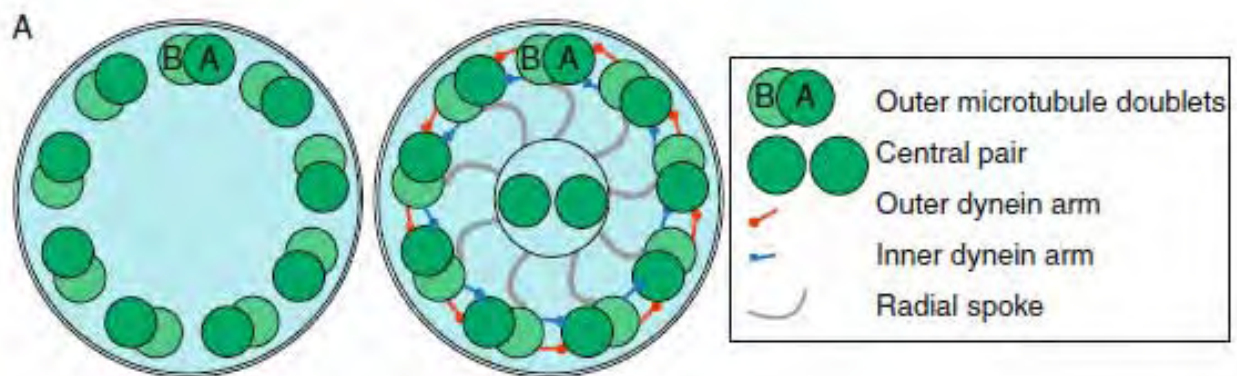


Figure 5 : Schéma de la structure de l'axonème des cils. A gauche, structure d'un cil 9+0, constitué de 9 doublets de microtubules. A droite, cil en 9+2, comprenant deux microtubules centraux. (Basu et Brueckner, 2008)

d'oméprazole conduit, comme chez le xénope, à la production de larves symétriques (Hibino et al., 2006). Ce mécanisme ionique semble donc être conservé entre échinodermes et vertébrés. Au sein des modèles animaux vertébrés, l'implication d'un tel mécanisme est mise en balance avec une seconde étape, plus tardive, tout aussi essentielle à la mise en place de l'asymétrie gauche-droite.

1.2.2. Modèle du nœud cilié

C'est une observation faite sur des patients atteints du syndrome de Kartagener qui est à l'origine de la découverte du deuxième élément clé de la mise en place de l'asymétrie gauche-droite. Il y a presque 50 ans maintenant, Bjorn Afzelius remarqua que les patients atteints du syndrome de Kartagener présentaient des spermatozoïdes immobiles ainsi que des pneumopathies. Ces deux symptômes pouvaient être expliqués par le manque de mobilité des flagelles des spermatozoïdes et l'immobilité des cils présents dans les poumons qui permettent de chasser les mucosités. Afzelius observa que 50% des patients présentaient un *situs inversus* (Afzelius, 1976). Pour expliquer le lien entre la latéralité des organes et l'action des cils, il émit l'hypothèse que les cils devaient créer un flux qui avait pour finalité d'orienter la latéralité. C'est ainsi que la première corrélation entre cils et asymétries fût faite.

Les cils sont des extensions cellulaires composées de microtubules ordonnés en structures stéréotypées dont on distingue deux catégories : les cils dits en 9+0 dont l'axonème est constitué de neuf doublets de microtubules organisés en cercle et les cils dits en 9+2 où les neuf doublets encerclent deux microtubules centraux et indépendants (Figure 5).

Des mutations de la kinésine KIF3 ont permis de mettre en évidence la nécessité de former des cils mobiles pour organiser l'asymétrie gauche-droite ; en effet, en absence de KIF3b, la ciliogenèse est abolie et la latéralité est aléatoire (Nonaka et al., 1998).

De plus, la left-right dynein (LRD) qui participe au mouvement des cils dont la mutation entraîne également une perte de la latéralité de l'asymétrie gauche-droite, démontre incontestablement qu'un flux créé par les cils est indispensable à la mise en place de l'asymétrie gauche-droite. En effet, la mutation de la LRD, chez la souris, induit une hétérotaxie. La LRD est spécifiquement exprimée dans une structure appelée nœud embryonnaire (Supp et al., 1997). Le nœud embryonnaire présent chez le xénope, la souris, le lapin et appelé vésicule de Kupffer chez le poisson-zèbre, ou nœud de Hensen chez le poulet, est une structure transitoire remplie de fluide qui se forme au niveau postérieur de la

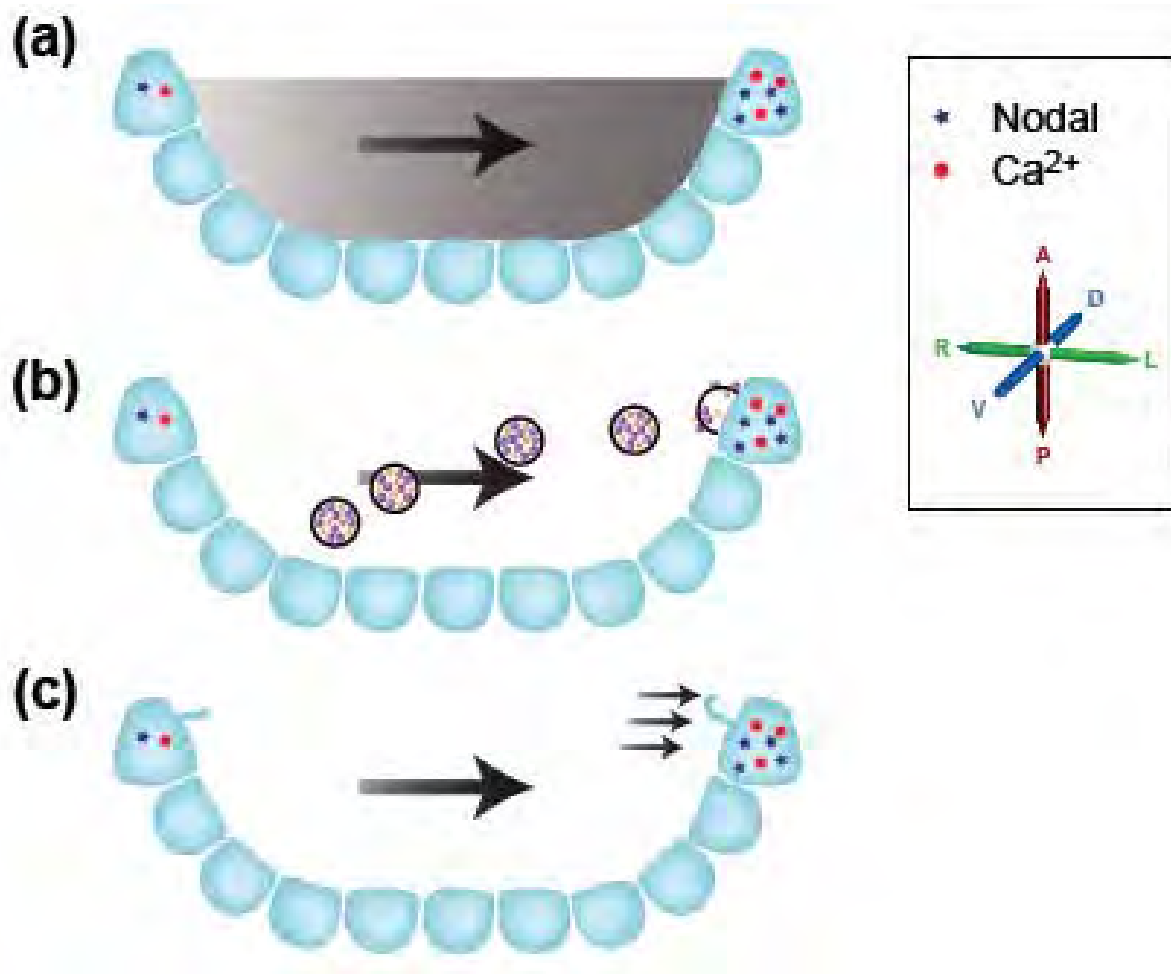


Figure 6 : Les trois modèles du flux nodal : a) Modèle du morphogène : le morphogène est distribué asymétriquement grâce au flux présent dans le noeud. b) Modèle des vésicules nodales : des vésicules contenant une molécule signalisante sont déplacées vers la gauche grâce au flux nodal. c) Modèle des deux cils: des cils mécanosensoriels immobiles situés sur les bords du noeud captent de manière physique le flux. Les trois modèles débouchent sur l'activation de la signalisation Ca^{2+} du côté gauche. (Norris, et al., 2005)

notochorde. Les cellules présentes dans cette structure sont dotées de cils mobiles qui ont pu être imagés par microscopie électronique alors qu'ils étaient en mouvement. L'imagerie en temps réel sur des embryons de souris a permis de prouver l'existence d'un flux au niveau du nœud appelé flux nodal (Nonaka et al., 1998). En effet, le battement circulaire des cils permet de déplacer vers la gauche de petites billes fluorescentes ajoutées au milieu de culture. Les billes en périphérie du nœud ne bougeant pas, ce mouvement est restreint à cette région seulement. Dans un mutant *Kif3b*, les cils sont immobiles et le flux est aboli. Les cils sont implantés en postérieur de la cellule porteuse et ont un mouvement elliptique ce qui permet de générer un flux directionnel (Nonaka et al., 2005).

Bien que certaines études défendent le fait que le flux Nodal est la première étape pour l'établissement des différences entre droite et gauche, le fait que ce flux maintienne une asymétrie pré-existante est plausible. Le fait que le nœud soit lui-même asymétrique chez le poulet est en faveur de cette dernière hypothèse. En effet, d'une part la partie gauche du nœud de Hensen est plus épaisse que la partie droite et d'autre part les mouvements cellulaires au sein du nœud sont plutôt convergents à droite et divergents à gauche (Dathe et al., 2002; Gros et al., 2009).

Le flux nodal est donc perçu par l'embryon comme un signal d'asymétrie. Trois hypothèses peuvent actuellement expliquer comment cela se produit (Figure 6) :

Premièrement, l'hypothèse du morphogène suppose qu'un morphogène enrichi à gauche du nœud suite à l'action du flux nodal permet d'amorcer en cascade l'expression de gènes à gauche de la ligne médiane.

Deuxièmement, l'hypothèse des particules vésiculaires nodales (nodal vesicular parcel ou NVP) pose l'existence de vésicules dans le nœud qui sont transportées par le flux cilié et repoussées vers la gauche. Elles jouent un rôle de cargo pour des molécules signalisantes comme les morphogènes.

Enfin, l'hypothèse des « deux cils » explique la captation du flux nodal par la présence de cils mécano-sensoriels immobiles au niveau des bords du nœud qui capteraient le flux seulement à gauche (McGrath et al., 2003). Cette hypothèse n'implique pas l'action d'un morphogène mais l'existence de deux types de cils : des cils motiles responsable du flux et des cils immobiles, mécano-transducteurs qui captent le signal «flux». Une population de cils, différente de celle marquée par la LRD, est présente au niveau des bords du nœud et est caractérisée par l'expression de la polycystine-2 (*pdk-2*), une pompe à cation activée par le calcium. La population de ces cils immobiles située à gauche se courberait sous l'effet du flux et entraînerait ainsi la transduction du signal par activation de signalisation intracellulaire. Ce

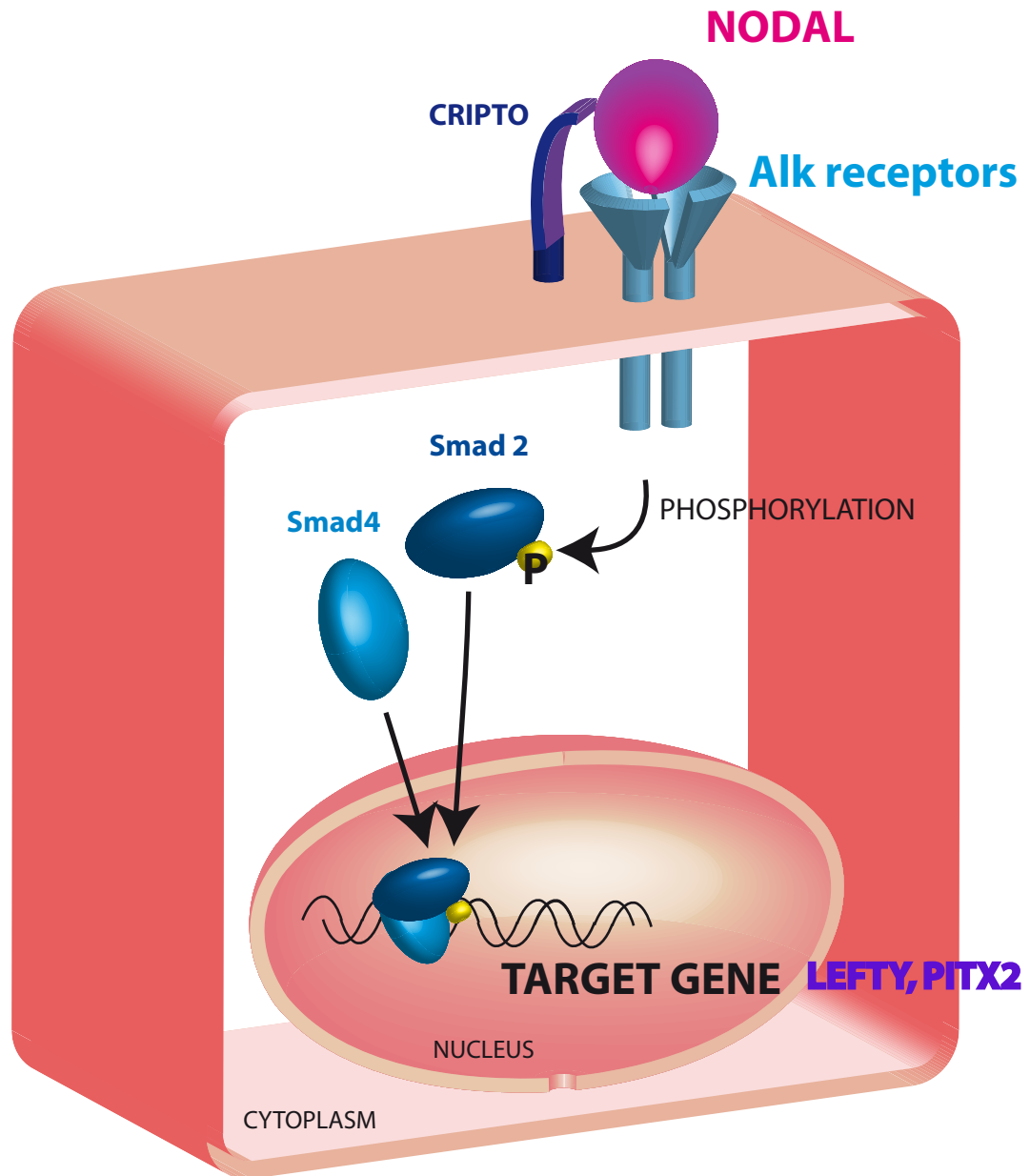


Figure 7 : Schéma du fonctionnement de la voie Nodal

Le ligand Nodal se fixe aux récepteur Alk (sérine/thréonine kinase) en présence d'un cofacteur, Cripto, qui confère une spécificité à cette liaison. L'activation du récepteur induit la phosphorylation du facteur cytoplasmique Smad2 qui se lie à Smad4. Le complexe Smad est ensuite transloqué dans le noyau pour activer la transcription de gène cible dont *lefty* et *pitx2*.

phénomène est également présent au niveau de l'épithélium rénal qui porte également des cils mécano-sensoriels et qui permettent de détecter le flux d'urine.

Quelle que soit l'hypothèse privilégiée, en aval de flux nodal, un signal Ca^{2+} est observé sur les rebords du nœud et est plus fort à gauche qu'à droite. Ce signal calcium est dépendant du flux car il n'est pas observé lorsque les cils sont immobiles (perte de fonction pour de LRD) ou si les cils mécano-sensoriels sont absents (mutant pour la polycystine-2) (McGrath et al., 2003). Le flux induit une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} qui provoque la phosphorylation des kinases Ca^{2+} /CaM dépendantes pour activer le re-larguage du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et créer un flux extracellulaire de Ca^{2+} .

I.3. Mise en place de l'asymétrie viscérale

L'une des conséquences évidente de la rupture de la symétrie par ces mécanismes précoces est l'organisation des organes internes constitués ou positionnés asymétriquement. Les mécanismes du flux ionique et du flux nodal doivent être propagés pour permettre une architecture interne correcte. Bien que la transition entre signal calcique et expression asymétrique de gène ne soit pas encore claire, les premiers gènes exprimés asymétriquement appartiennent aux composants de la voie de signalisation Nodal.

I.3.1. Rôle de la voie Nodal

Nodal est un ligand soluble qui appartient à la famille des TGF- β (Transforming Growth factor). Il possède trois orthologues: *southpaw* (spw), *cyclops* (cyc) et *squint* (sqt) chez le poisson zèbre et six chez le xénope (*Xenopus Nodal related 1* à 6). Comme la plupart des TGF β , Nodal se fixe sur les récepteurs sérine/thréonine kinase, AlkI et II, en présence d'un co-facteur EGF-CFC, *cripto* (ou *one-eyed pinehead*, *oep*, chez le poisson zèbre). Cette fixation va déclencher la phosphorylation des facteurs cytoplasmiques Smad-2. La forme phosphorylée de Smad-2 va se lier au facteur Smad-4. Ce complexe Smad2-4 est transloqué et accumulé dans le noyau où, par liaison avec d'autres facteurs comme Foxh1, il va induire l'expression de gènes cibles. L'un des gènes cible est *lefty* qui agit également comme répresseur de la voie Nodal créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif (Figure 7).

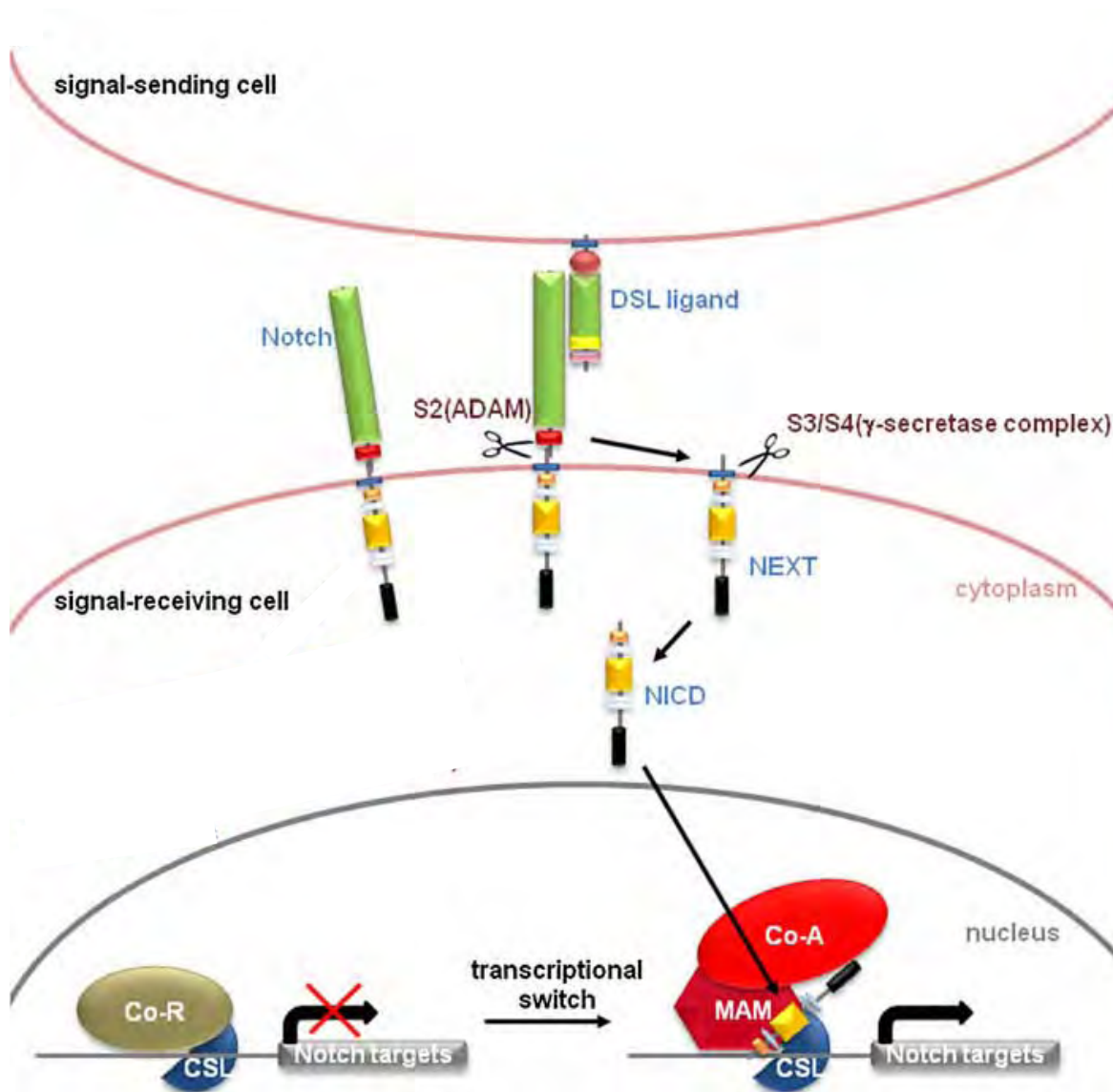


Figure 8 : Schéma mécanistique de la voie Notch.

Le ligand Delta ancré à la membrane de la cellule signalisante va se lier au récepteur Notch porté à la membrane d'une autre cellule. Cette liaison va induire le clivage de la partie intracellulaire du récepteur Notch (NICD) par la gamma sécrétase. NICD est ensuite transloqué dans le noyau où il active ou réprime, selon les cofacteurs recrutés, la transcription de gènes cibles. (Adapté de Kato ,2011)

I.3.1.a. Propagation de l'information du nœud au mésoderme latéral

- La voie de signalisation Notch induit l'expression de Nodal autour du nœud embryonnaire.

A la périphérie du nœud, Nodal est initialement exprimé bilatéralement (Brennan et al., 2002). Le système de communication Notch est nécessaire à cette expression.

La voie Notch régule de nombreux processus dans le développement tels que la spécification, la différenciation et la prolifération des cellules. Grâce à l'interaction entre le récepteur transmembranaire, Notch, et le ligand ancré à la membrane, Delta, deux cellules adjacentes peuvent interagir. La liaison ligand-récepteur induit le clivage de la partie intracellulaire du récepteur Notch (« Notch Intra Cellular Domain », NICD) par une γ -sécrétase. NICD est ensuite transloqué dans le noyau où il active ou réprime, selon les cofacteurs recrutés, la transcription de gènes cibles (Figure 8).

La perte de fonction du ligand *delta-1* ou des récepteurs *Notch-1* et *-2* chez la souris induit des défauts de latéralité via la suppression de l'expression de Nodal dans la région périnodale. Par ailleurs, des sites de fixation des effecteurs de Notch tels que Suppressor of Hairless Su(H) ont été identifiés sur les régions régulatrices de Nodal (Raya et al., 2003). Notch agit donc sur l'initiation de l'expression de Nodal (Krebs et al., 2003). Dans les embryons où les cils nodaux sont immobiles suite à la mutation des gènes KIF3A ou LRD, l'expression des différents interacteurs de la voie Notch ne montre pas d'altération de leur profil. Ceci suggère que le mécanisme de l'induction de Nodal par la voie Notch se fait indépendamment du flux cilié (Raya et al., 2003). Cependant, la sur-activation de Notch par surexpression de NICD permet d'accroître la longueur des cils du nœud alors que la perte de Delta la réduit chez le poisson zèbre. Même si la voie Notch/Delta influe sur la longueur des cils, sa manipulation n'altère pas le flux nodal (Lopes et al., 2010).

- Deux séquences régulatrices différentes de Nodal régulent l'expression dans la région périnodale et dans la LPM.

Chez le poisson zèbre, le gène *southpaw* est exprimé des deux côtés du nœud au stade 4-6 somites mais, rapidement, son expression devient asymétrique et restreinte à la plaque latérale du mésoderme (LPM) (Long et al., 2003).

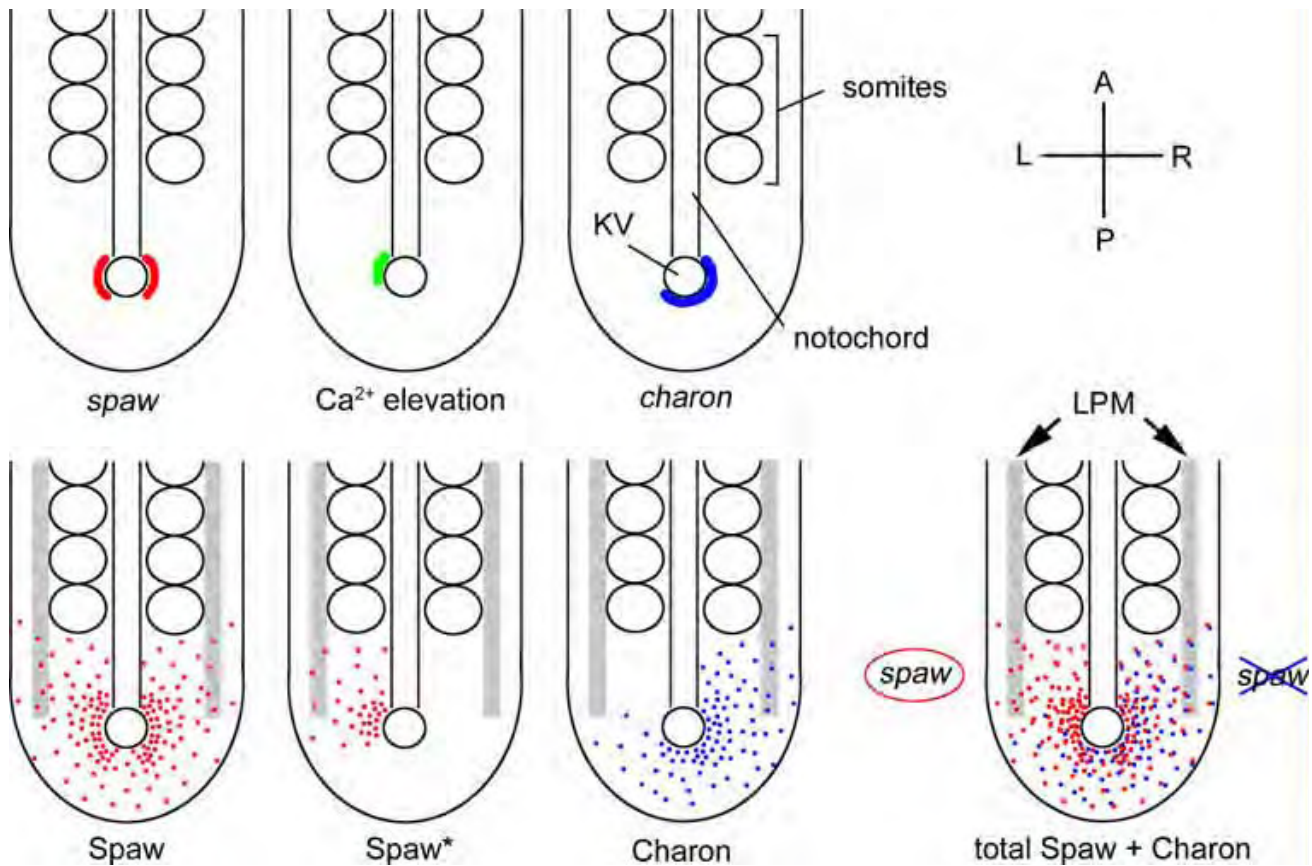


Figure 9 : Transfert de signal de la vésicule de Kupffer à la LPM.

Spaw est exprimé bilatéralement autour du noeud et diffuse symétriquement. En réponse à la signalisation calcique à gauche du noeud, l'expression/l'activation de *spaw* est induite à gauche. Au même moment, *Charon* est exprimé asymétriquement à droite. Comme *Charon* est un antagoniste de *Spaw* par fixation sur celui-ci, *spaw* ne peut pas activer sa propre expression à droite, ce qui empêche *spaw* d'activer sa propre expression dans la LPM. (Matsui 2012)

Deux séquences régulatrices du gène Nodal sont décrites pour son expression bilatérale au niveau du nœud et asymétrique au niveau de la plaque mésodermique latérale. Une région en amont de Nodal (-9.5 à -8.7kb) induisant l'expression de Nodal bilatéralement au niveau du nœud a pu être mise en évidence. La région qui permet l'expression restreinte à gauche se trouve quant à elle dans le premier exon de Nodal (Adachi et al., 1999; Norris and Robertson, 1999).

- Induction de l'expression de Nodal dans la plaque mésodermique latérale.

L'expression bilatérale de Nodal au niveau du nœud devient unilatérale au niveau du mésoderme latéral. Si l'activation asymétrique de la signalisation calcique pourrait promouvoir la sécrétion de Spaw à gauche, *charon*, un antagoniste de Nodal semble également avoir un rôle chez le poisson zèbre. En effet, *charon*, membre de la famille de *cerberus*, est exprimé bilatéralement puis est restreint au côté droit du nœud. Les gradients opposés de *spw* et *charon* permettent de restreindre l'expression de *spw* sur la gauche. Grâce à la boucle d'auto-contrôle de *spw* par lui-même, *spw* induit et maintient sa propre expression dans la plaque mésodermique latérale gauche ainsi que le maintien de son expression (Figure 9) (Matsui and Bessho, 2012).

L'expression de *spw* dans cette région va permettre l'induction de gènes cibles de la voie Nodal dont *pitx2*, *lefty-1* et 2 dont l'expression est essentielle pour la mise en place directionnelle des viscères. L'induction par Nodal de l'expression de *lefty-1* au niveau de la ligne médiane et de *lefty-2* (Saijoh et al., 2000) sur le bord externe de la LPM créent des barrières à l'activité de Nodal. Celles-ci restreignent l'activité de Nodal à une zone précise de plaque latérale. *Lefty-1* marque également une délimitation entre la gauche et la droite afin d'éviter tout signal parasite à droite. Même si l'expression de Nodal au niveau du nœud présente une subtile asymétrie, la façon dont le signal ne se propage qu'à gauche n'est pas encore totalement élucidée (Figure 10, (Kato, 2011)).

- L'activité asymétrique de la voie Nodal est requise chez les vertébrés et chez les échinodermes.

Dans les espèces vertébrées, la voie Nodal est active dans le mésoderme gauche. Chez l'oursin, Nodal ainsi que les gènes cibles de la voie *lefty* et *pitx2* sont exprimés à droite. L'activité de cette voie est nécessaire à la mise en place de l'asymétrie gauche-droite. En

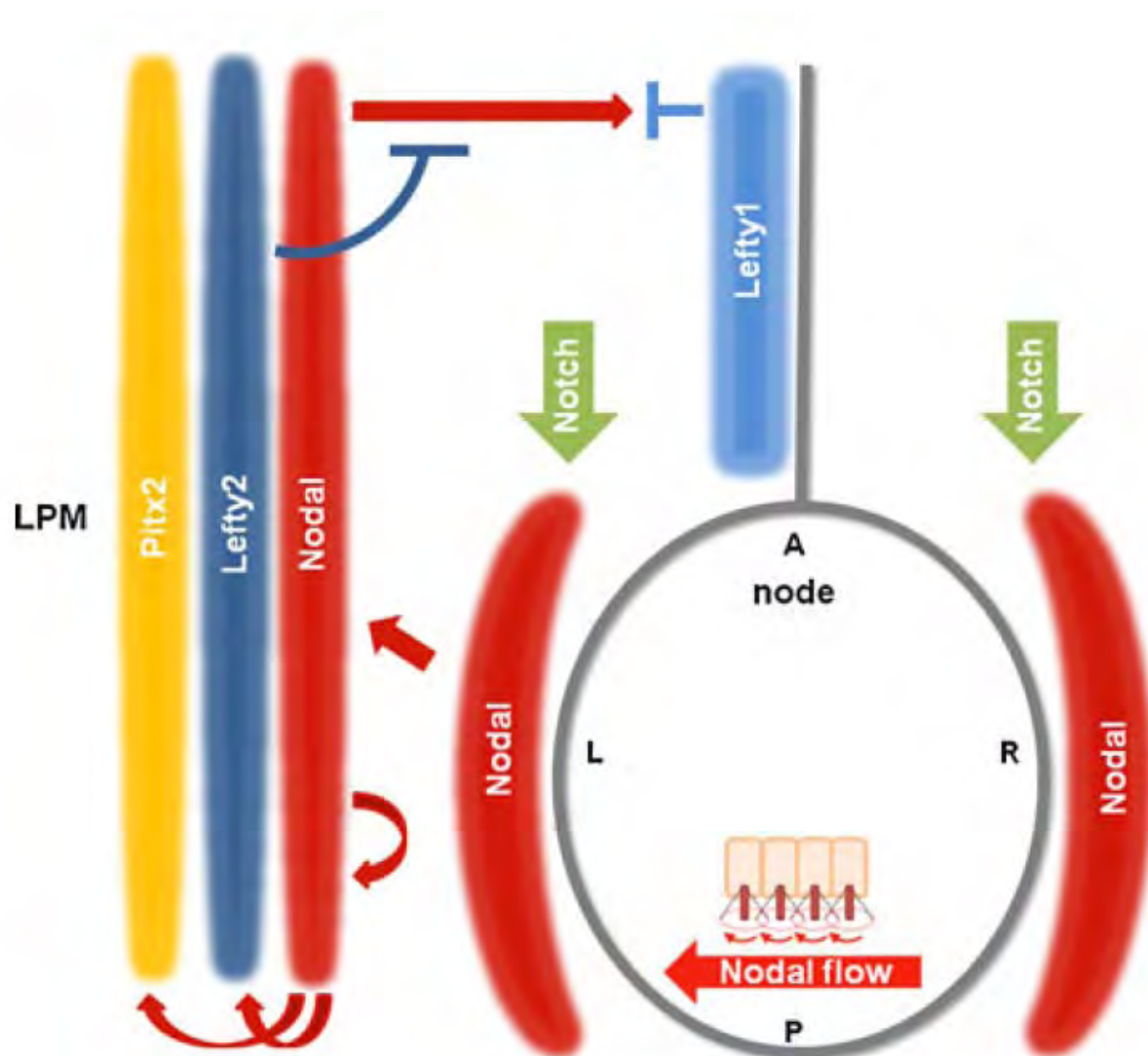


Figure 10 : Induction de Nodal dans la plaque mésodermique latérale.

La voie Nodal est induite à la périphérie du noeud grâce à la voie Notch. Nodal induit son expression dans la plaque mésodermique gauche. Nodal va provoquer l'expression de ces gènes cibles dans la plaque mésodermique dont *lefty-2* qui est son inhibiteur. Par ailleurs, Nodal induit également la production de Lefty-1 au niveau de la ligne médiane créant ainsi une barrière de diffusion. (Kato et al., 2011)

effet, l'injection d'oligonucléotides antisens provoque la radialisation de la larve d'oursin. Mais au lieu de promouvoir l'identité gauche comme chez les vertébrés, la voie Nodal réprime la formation à droite d'une structure appelée rudiment. Le rudiment est la partie de la larve qui donnera l'oursin adulte après métamorphose. Lorsque l'expression de nodal est abolie, deux rudiments sont formés ce qui a pour conséquence la formation d'oursins siamois (Duboc et al., 2005).

Alors que chez les vertébrés, la voie Notch/Delta est nécessaire pour induire l'expression de Nodal, chez l'oursin, elle réprime la voie Nodal à gauche. En effet, le blocage spécifique de la voie par la drogue DAPT ([N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine-butyl ester), ou par injection de morpholino contre Delta induit l'expression bilatérale de Nodal (Bessodes et al., 2012)

- Nodal agit comme un morphogène diffusible.

L'activité de la voie Nodal au niveau du nœud permet d'activer Nodal au niveau de la LPM mais aussi de créer une barrière à sa propre activité en provoquant l'expression de son antagoniste *lefty* dans la LPM et au niveau de la ligne médiane. Deux modèles peuvent être envisagés pour expliquer la propagation du signal nodal du nœud vers le mésoderme latéral : un signal direct ou un signal indirect qui passerait via des signaux relais.

Il semble que la propagation du signal nodal se fasse par un passage à l'intérieur du tissu, via le mésoderme paraxial. L'ajout de ligand Nodal dans le milieu de culture d'embryons de souris n'est pas suffisant pour induire l'expression ectopique de Nodal dans le mésoderme latéral droit, éliminant ainsi l'hypothèse d'une propagation directe du signal au sein du tissu (Oki et al., 2007).

La propagation du signal dépend aussi du cofacteur *crypto* qui permet la spécificité de liaison du ligand Nodal au récepteur. *Crypto* est exprimé dans le nœud, la LPM et la plaque du plancher de la corde. Le fait que *crypto* ne soit pas exprimé au niveau du mésoderme paraxial suggère que le signal n'est pas relayé directement par la voie Nodal.

Cependant, dans la perte de fonction spécifique de *Crypto* au niveau du nœud embryonnaire (via l'utilisation de souris où *Crypto* est exprimé spécifiquement dans la LPM grâce au promoteur spécifique à cette région), les embryons de souris ne présentent pas de malformation de l'axe gauche-droite et Nodal est exprimé correctement dans la LPM, résultat en faveur du modèle de transmission directe du signal. Ce modèle de diffusion de Nodal est également supporté par le fait que des glycoaminoglycans sulfatés (GAGs), connus pour

contribuer à la mise en place des gradients de morphogènes, sont nécessaires à l'expression de Nodal dans le mésoderme latéral. Les GAGs sont exprimés au niveau du mésoderme paraxial, entre le nœud et la LPM de manière continue, et Nodal est capable de se lier *in vitro* aux GAGs. De plus, l'inhibition des GAGs dans l'embryon empêche le signal nodal de se propager du nœud vers la LPM.

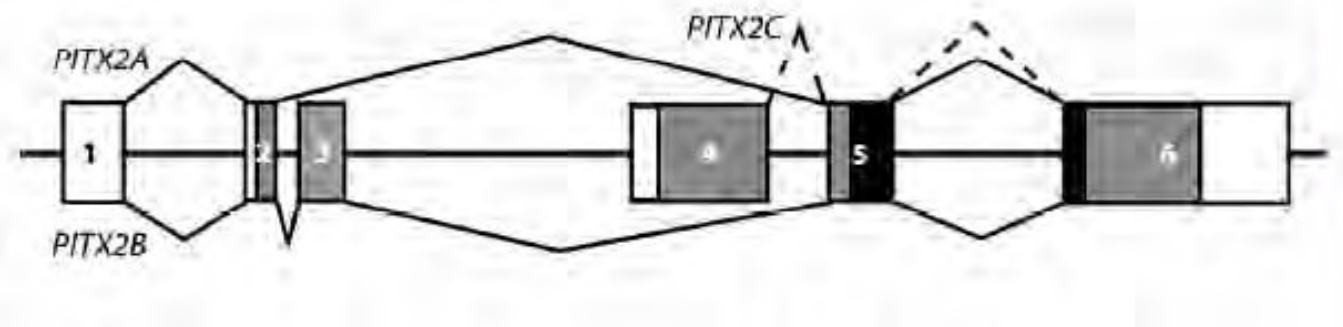
La diffusion de Nodal se fait donc sur une longue distance. Cette diffusion est permise par l'hétérodimérisation de Nodal avec le *Growth/differentiation factor -1* (GDF1). GDF-1 est exprimé, tout comme Nodal, dans la région péri-nodale et dans le mésoderme latéral et son expression est nécessaire et suffisante à l'expression de Nodal. En effet, les souris mutantes pour *Gdf1* ne présentent plus d'expression asymétrique de Nodal dans la LPM alors que l'expression de Nodal au niveau du nœud reste inchangée. GDF-1 agit ici comme un activateur de l'activité de Nodal ce qui permet à ce dernier de signaler sur une longue distance (Tanaka et al., 2007). La signalisation à courte distance semble, quant à elle, être indépendante de la présence de GDF-1. Chez les souris *gdf-1^{-/-}* où l'expression de GDF-1 est spécifiquement restaurée dans le nœud, l'expression de Nodal dans la LPM est partiellement restaurée.

I.3.1.b. Mise en place de l'asymétrie viscérale : implication de *pitx2*, gène cible de Nodal

Le signal d'asymétrie créé dans la LPM doit être relayé pour induire l'asymétrie des organes. Nodal est connu pour avoir une influence claire sur le placement des organes. Pour décrire le rôle de Nodal dans la formation de l'axe gauche-droite, Collignon et al (Collignon et al., 1996) ont utilisé une mutation insertionnelle appelé *inv* chez la souris. Celles-ci présentent des défauts d'asymétrie gauche-droite. Les mutants homozygotes présentent un *situs inversus* (ou un *situs ambiguus*) dans 100% des cas et les hétérozygotes dans 20%. Des hybridations *in situ* ont permis de mettre en évidence une expression de Nodal dans la LPM droite chez les embryons *situs inversus*. Certains individus présentent une expression de Nodal tronquée rostralement, phénotype corrélé avec une position aberrante du cœur. Il y a donc un lien étroit entre l'expression asymétrique de Nodal et la latéralité des organes (Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996).

La propagation du signal Nodal passe par ces gènes cibles dont *pitx2* qui joue un rôle clé dans l'asymétrie viscérale. *Pitx2* est un facteur de transcription à homéo-boîte de type

A



B

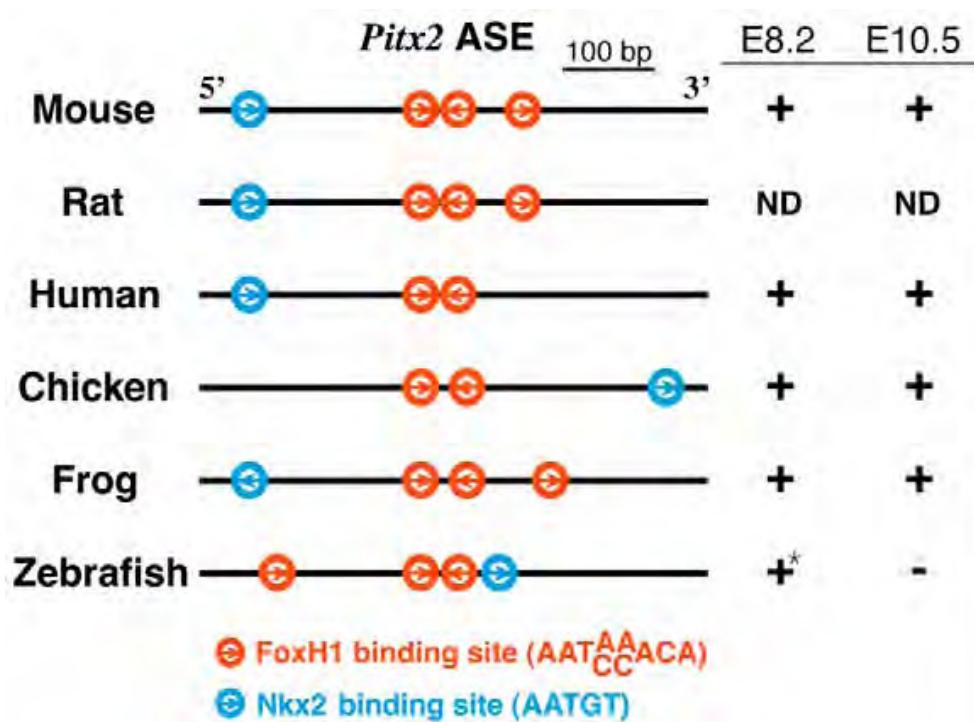


Figure 11 : Structures des isoformes de Pitx2.

A) Représentation de la structure des différentes isoformes de Pitx2 chez la souris et l'humain.

B) Conservation des motifs de liaison de Foxh1 et Nkx2 sur le promoteur de *pitx2* qui conduit à une expression asymétrique de ce gène.

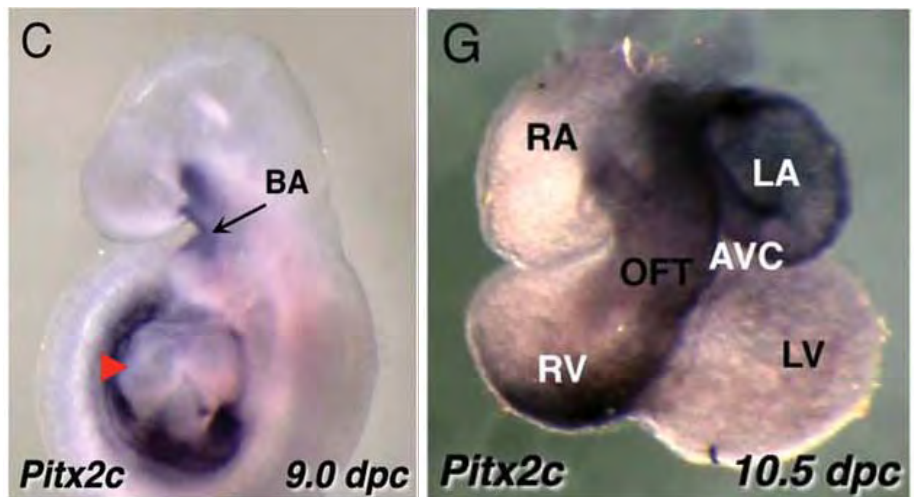
(Lamba 2008 et Shiarori 2006)

bicoid. C'est un des gènes cibles direct de Nodal. Il en existe quatre isoformes : *pitx2a* est exprimé essentiellement bilatéralement notamment le mésenchyme, les somites et les bourgeons de membre. *pitx2b* quant à lui, n'est pas exprimé lors de l'embryogenèse. Contrairement à *pitx2a*, *pitx2c* est exprimé exclusivement de façon asymétrique dans la LPM et, de plus, son expression persiste dans le primordium de nombreux organes situés ou constitués asymétriquement. Une quatrième isoforme, *pitx2d* est présente seulement chez l'Homme. Ces isoformes sont issues d'un même gène mais de promoteurs (*pitx2c*) ou d'épissages alternatifs (*pitx2a* et *b*) (Lamba et al., 2008). Au niveau de la structure des protéines, Pitx2a, Pitx2b, et Pitx2c ont un domaine C-terminal commun alors que leurs domaines N-terminaux sont différents. *Pitx2d* ne possède pas de domaine N-terminal et une partie de l'homédomaine est absent de sa structure (Figure 11).

Chez l'homme, le syndrome de Rieger est causé dans 50% des cas par des mutations présentes sur le locus de *pitx2* (notamment des domaines c-terminaux tronqués et des mutations ponctuelles dans l'homéoboîte). C'est à cause de sa caractérisation dans le contexte de cette maladie que *pitx2* est aussi appelé RIEG qui est l'homologue humain de *pitx2a* (Semina et al., 1996). Le syndrome de Rieger est une maladie autosomale dominante qui conduit à des désordres de la morphogenèse. En effet, les patients atteints de ce syndrome présentent des anomalies au niveau oculaire (hypoplasie de l'iris, glaucome, déplacement de la pupille), dentaire (hypodontie ou microdontie), de la face, de nombreux défauts systémiques qui peuvent également être associés à des déficiences en hormones de croissance (Amendt et al., 2000). Cependant, aucun défaut de symétrie ou d'asymétrie n'est rapporté dans le tableau clinique de ce syndrome.

Pourtant, chez de nombreux organismes modèles des défauts dans l'expression du gène *pitx2* causent des isomérismes. C'est notamment le cas chez la souris où le mutant nul pour *pitx2* induit un isomérisme droit du poumon (Gage et al., 1999). *Pitx2* est donc responsable de l'acquisition de l'identité gauche. Ces souris *pitx2*^{-/-}, où la partie C-terminale est excisée, présentent une létalité embryonnaire entre E9,5 et E10,25 car les organes sont à l'extérieur du corps suite à un défaut de fermeture de la partie ventrale (Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999). Par ailleurs, on note de nombreux autres problèmes d'organisation (estomac souvent tourné vers la gauche plutôt qu'à droite dans les individus sauvages) et de morphogenèse notamment au niveau de l'appareil cardiovasculaire : cœur placé à gauche dans un cas sur deux, ventricule pulmonaire étendu à droite, hypoplasie des ventricules qui empêche leur fusion, atria non septés. Enfin, on peut noter dans ce knock-out des défauts dans le

I



II

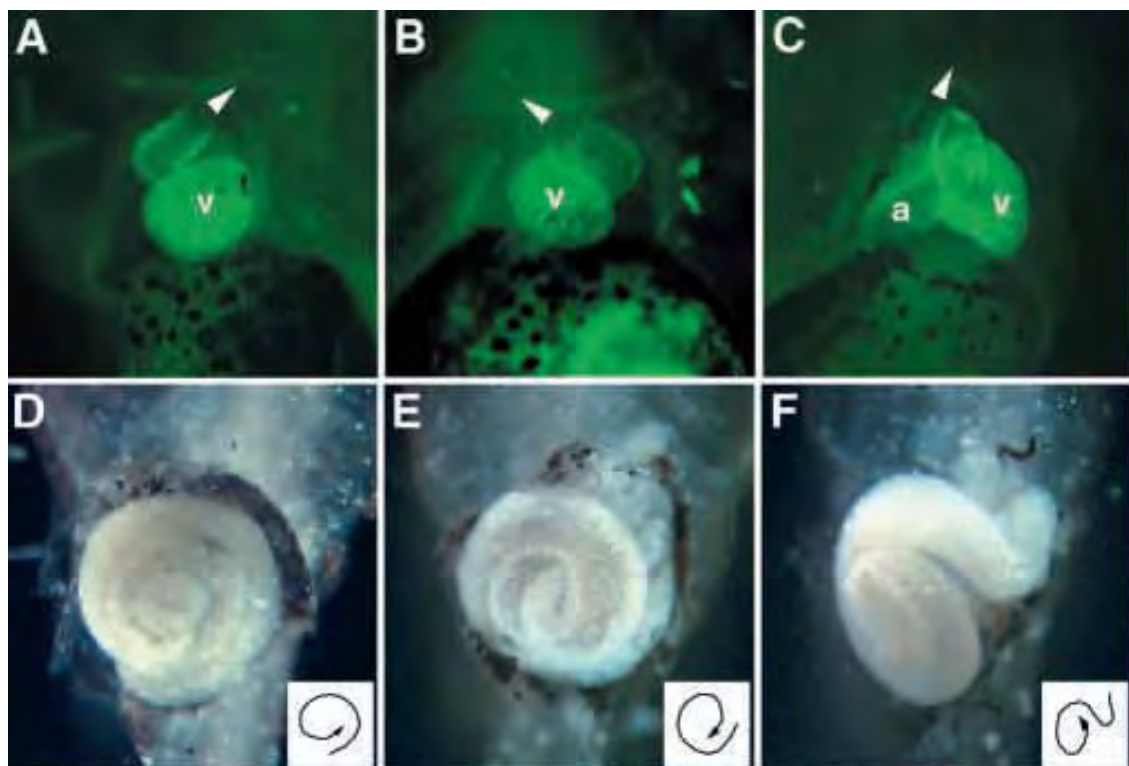


Figure 12 : *pitx2* et latéralité des viscères.

I) Expression de *pitx2c* dans l'embryon de souris *in toto* ainsi qu'au niveau du coeur.

BA, branchial arches; OFT, outflow tract; RA, right atrium; LA, left atrium; RV, right ventricle; LV, left ventricle; AVC, atrioventricular canal. (Furtado et al., 2001)

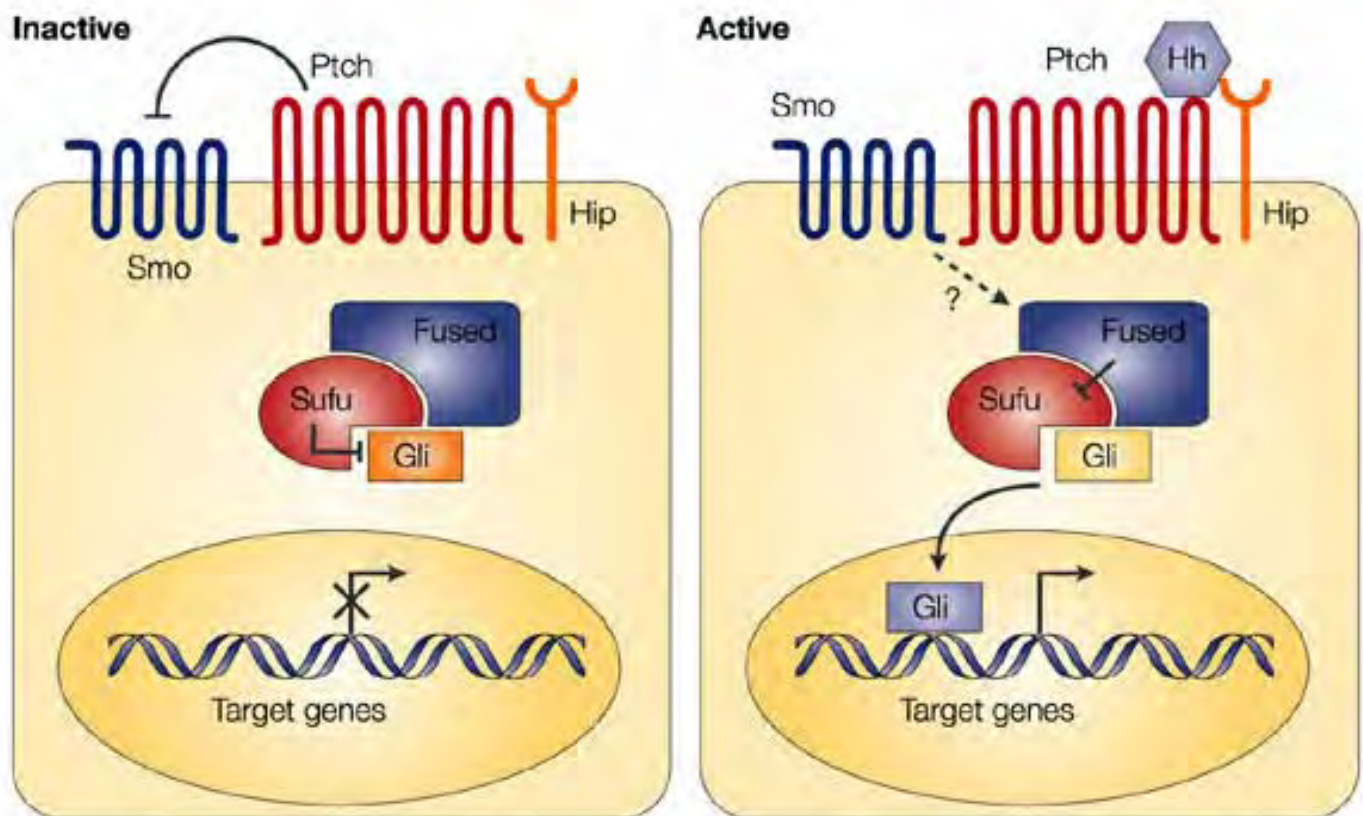
II) L'expression ectopique de *pitx2c* affecte la morphogénèse du coeur et des intestins chez le xénope.

A) Morphologie cardiaque normale dans un embryon non injecté. B) Coeur en miroir dans un embryon injecté avec *pitx2a*. C) Coeur mal formé mais avec une latéralité normale chez un embryon gain de fonction pour *pitx2c*. D) Enroulement normal (sens inverse des aiguilles d'une montre) des intestins chez un embryon de xénope sauvage. Enroulement inversé (E) et anormal (F) chez un embryon injecté avec *pitx2a*. (Levin et al., 2002)

développement des dents ainsi que l'hypoprolifération du foie, de la rate, de la mandibule, de l'œil et de la musculature péri-orbitale (Lin et al., 1999). Un *knock-out* de l'isoforme 2c, seule isoforme à être exprimée asymétriquement, a été réalisé chez la souris. Ces mutants présentent eux aussi de graves défauts de développement cardiaque et du réseau veineux pointant l'importance de *pitx2c* dans la morphogenèse cardiaque (Liu et al., 2002).

A travers les différentes pertes de fonction de *pitx2* chez la souris, on prend conscience de la nécessité de l'expression de *pitx2* et plus précisément de *pitx2c* pour la morphogenèse cardiaque. L'utilisation d'une lignée rapportrice a permis la caractérisation de l'expression de *pitx2c* dans le cœur où elle est restreinte à certaines régions dont le ventricule droit et l'atrium gauche (Figure 12-I) (Furtado et al.). Des études précises de traçage cellulaires chez la souris ont permis de mettre en évidence la présence de cellules filles de celles qui exprimaient *pitx2c* dans les valves cardiaques ainsi que dans les septums atrio-ventriculaires. Chez les individus *pitx2c*^{-/-}, ces cellules ne réussissent pas à gagner ces régions, suggérant l'existence d'une influence de *pitx2c* dans la migration des cellules qui constituent ces structures (Liu et al., 2002).

L'expression asymétrique de *pitx2* est due à un enhancer asymétrique spécifique (ASE). Cet enhancer contient d'une part trois sites de fixation pour FoxH1, composant de la voie de signalisation Nodal, qui sont essentiels à l'initiation de l'expression. D'autre part, on retrouve un site de liaison pour le facteur de transcription Nkx2 qui est essentiel pour le maintien de l'expression (Shiratori et al., 2001). La structure de cet enhancer est grandement conservée chez les vertébrés (Shiratori et al., 2006). Les souris où l'enhancer ASE a été spécifiquement excisé, et où l'expression de *pitx2* dans la LPM est abolie, se développent normalement jusqu'au stade de l'apparition des premières somites. Après ce stade, de nombreux problèmes dans l'architecture gauche-droite apparaissent : ceux retrouvés dans le mutant nul pour *pitx2* et *pitx2c* mais aussi un positionnement anormal de la veine azygos et de l'aorte à droite dans le thorax, la présence d'autres connexions veineuses/artérielles aberrantes, une rotation anormale des intestins notamment au niveau du duodénum, et un pancréas situé à droite ou en ventral du duodénum. La perte de l'expression asymétrique de *pitx2* dans la LPM est clairement à l'origine de défauts d'asymétrie gauche-droite. Cependant certains organes ne sont pas atteints dans la perte de fonction de l'expression asymétrique de *pitx2*. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme de régulation de l'asymétrie indépendant de *pitx2* mais dépendant de Nodal, car dans la perte de fonction de *crypto* ou *foxh1* ces organes sont affectés.



Nature Reviews | Cancer

Figure 13 : Schéma du fonctionnement moléculaire de la voie Hedgehog.

En l'absence de ligand (à gauche), le récepteur Patched (Ptch) réprime le récepteur Smothened (smo). Si le ligand Hedgehog (Hh) se lie à Ptch (à droite), Smo est actif et permet l'activation de Gli dans le cytoplasme. La translocation dans le noyau de ce dernier permet d'induire la transcription de gènes cibles.

(Marina Pasca di Magliano & Matthias Hebrok, 2003)

Il semble que l'influence de *pitx2c* sur le développement asymétrique des organes soit dose dépendant. Chez les souris hétérozygotes mutantes pour la forme c, la dose de *pitx2c* est réduite de moitié et la formation de l'atrium est normale ; par contre, les poumons sont isomériques. La morphogenèse correcte des poumons ne se fait que si les deux copies sauvages du gène s'expriment. De faibles doses de *pitx2c* suffisent à créer l'identité gauche de l'atrium alors que la morphogenèse pulmonaire nécessite des doses élevées (Gage et al., 1999; Liu et al., 2001).

C'est en fait la partie N-terminale de la protéine Pitx2c qui est essentielle pour la morphogenèse asymétrique. Chez le poulet, le cœur fait une boucle vers la droite lors de sa morphogenèse, rotation due à la migration des cellules myocardiques qui ont pour conséquence de convertir l'axe gauche-droite en axe dorso-ventral du tube cardiaque, donnant ainsi l'orientation du futur cœur. Des injections de variant de *pitx2c* qui ne contiennent que la partie N-terminale ou qui sont amputées de cette même partie ont permis de montrer que la direction de la boucle cardiaque était changée : l'expression ectopique de la partie N-terminale de *pitx2c* par injection dans le côté gauche de l'embryon induit une augmentation de la proportion d'individu où le cœur fait une boucle à gauche. La partie N-terminale de *pitx2c* est donc capable d'orienter l'asymétrie du cœur (Simard et al., 2009).

Les gènes cibles du facteur de transcription *pitx2* impliqués dans la mise en place n'ont pas été identifiés. Seul *snR* (*snail related*), un antagoniste de *pitx2* a été mis en évidence chez le poulet. SnR est asymétriquement exprimé à droite dans la LPM (Isaac et al., 1997) et pourrait expliquer la restriction stricte du patron d'expression de *pitx2c* à gauche.

En parallèle du rôle central que joue *pitx2* dans la morphogenèse, la latéralité et l'asymétrie cardiaque, ce gène agit également sur un autre type d'asymétrie viscérale : l'enroulement des intestins. Chez le xénope et le poisson zèbre, les intestins s'enroulent sur eux-mêmes dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Des expériences de gain de fonction de *pitx2* chez le xénope et le zebrafish ont permis de montrer que, en plus d'un défaut de latéralité du cœur, la surexpression de *pitx2a* et *c* cause un défaut d'enroulement ou un enroulement dans le sens des aiguilles d'une montre des intestins (Figure 12-II) (Essner et al., 2000).

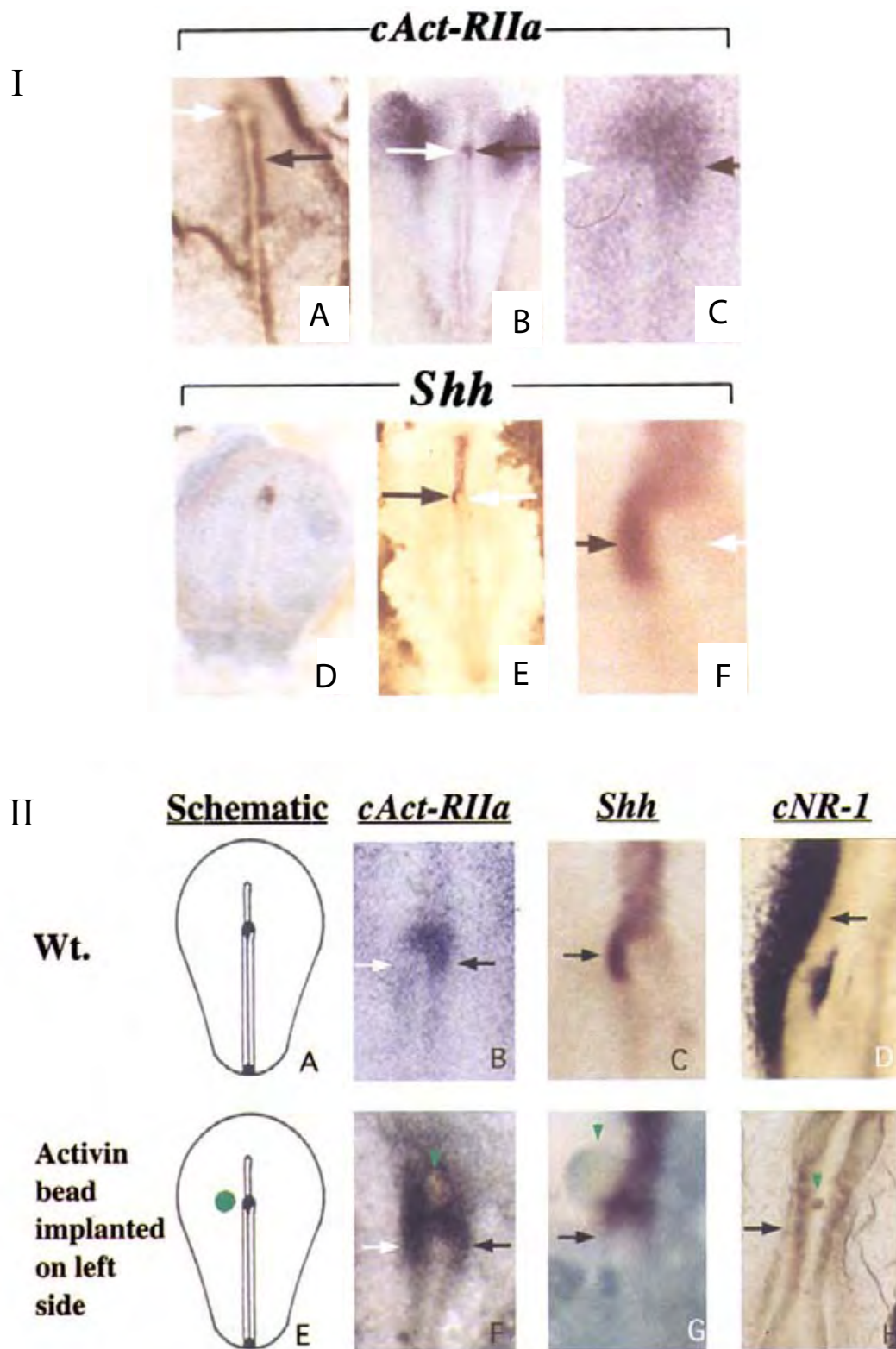


Figure 14 : Expression de Shh, du récepteur à l'Activin et de Nodal chez le poulet (Levin et al., 1995)

I) A- C: Expression du récepteur à l'activin *cAct-RIIa*. Au stade 4 (A) il n'y a pas d'expression dans le noeud. A partir de ce stade, le récepteur s'exprime à droite (B et grossissement en C).

D-E : Expression de *Shh*. Au stade 4 (D), l'expression est symétrique. Ensuite, l'expression est retreinte à la gauche du noeud (E et grossissement en F).

Panel II : Hybridation *in situ* dans des embryons sauvages et où une bille d'Activin été implantée à gauche du noeud. Les sondes *cAct-RIIa* (B), *Shh* (C) et *cNR-1* (D) révèlent l'expression asymétrique des gènes chez les individus sauvages. Dans les embryons où une bille d'Activin a été implantée, on note une expression ectopique à gauche du récepteur à l'Activin, une répression de *Shh* au niveau du noeud et de *cNr-1* dans la LPM.

(Levin et al., 1995)

1.3.2. Rôle de la voie de signalisation Shh

Shh (Sonic hedgehog) est un morphogène dont il existe trois formes chez les vertébrés : Shh, Ihh (indian hedgehog) et Dhh (desert hedgehog). Lorsqu'un des ligands se fixe sur le récepteur transmembranaire Patched, celui-ci active le récepteur Smoothed qui active le facteur cytoplasmique *gli*. Gli est transloqué alors dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles (Figure 13).

Alors que le rôle de la voie de signalisation Nodal est grandement conservé au sein des vertébrés, la voie Shh joue des rôles différents chez le poulet ou la souris.

Hh est exprimé aux abords du nœud de Hensen du côté gauche chez le poulet (Levin et al., 1995). Tout d'abord symétrique, l'expression du morphogène se restreint au côté gauche du nœud. Ce patron asymétrique perdure jusqu'à l'expression de Shh dans la notochorde. La restriction du patron de Shh coïncide avec l'expression cAct-RIIa (récepteur de l'Activin qui appartient à la famille des TGF- β) dans la partie droite du nœud (Figure 14-I). L'implantation de billes d'activin permettant d'induire l'expression du récepteur dans la partie gauche du nœud provoque l'extinction de l'expression de signal Hh à gauche. Activin réprime donc l'expression de Shh au niveau du nœud de Hensen (Figure 14-II). Dans le même temps, l'orthologue du ligand Nodal chez le poulet (cNR-1) est exprimé à gauche du nœud de Hensen. Des fibroblastes exprimant Shh implantés à droite du nœud de Hensen suffisent à induire la production de Nodal dans les cellules avoisinantes. Lors de l'infection de la LPM par des rétrovirus contenant *shh* l'expression de *pitx2* est elle aussi induite (Ryan et al., 1998). Shh induit le programme « gauche » au niveau du nœud et impose directement une latéralité aux organes. En effet, l'implantation de billes de *shh* à droite dans l'embryon de poulet induit des phénotypes d'hétérotaxie du cœur et/ou de l'estomac (Levin et al., 1997). Shh semble donc être un signal qui permet aux organes de recevoir une information gauche-droite commune qui permet de coordonner leur latéralité.

Chez la souris, Shh est exprimé symétriquement au niveau nœud mais la perte de Shh entraîne de nombreux défauts d'asymétrie : au niveau du cœur, le ventricule droit est réduit, l'apex du cœur pointe est mal orienté, les atria sont non septés ou atrophiés ; au niveau des poumons, les homozygotes mutants présentent des poumons hypoplasiques et ne comportant qu'un seul lobe. Au niveau moléculaire, les gènes spécifiquement exprimés à gauche présentent une expression altérée : *lefty-1* et *-2* sont absents et *pitx2* est bilatéral (Tsukui et al., 1999). Les mutants *Ihh*^{-/-} n'ont pas d'altération du patron de *pitx2* qui reste confiné à la LPM gauche. De manière surprenante, chez les souris mutantes pour Shh et Ihh (ou chez les

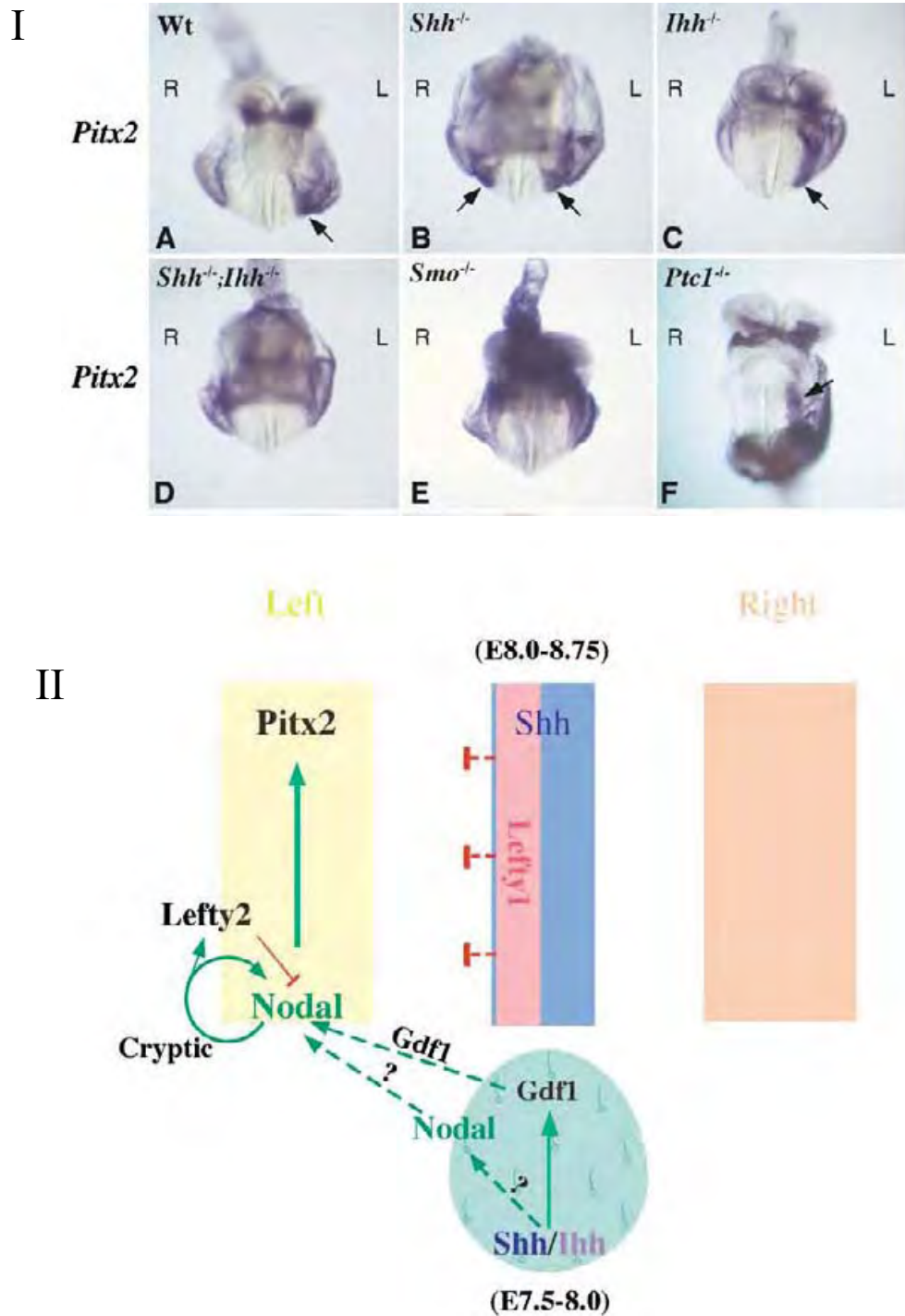


Figure 15 : Expression de Shh chez la souris.

I) Expression de *pitx2c* en hybridation *in situ* dans les différents contextes perte de fonction pour la voie de signalisation Shh.

II) Modèle pour le rôle de la voie de signalisation Hh dans la régulation de l'asymétrie gauche-droite chez la souris. Shh et Ihh agissent en amont de Gdf-1 qui est requis pour l'expression asymétrique de gènes dans le mésoderme latéral.

(Zhang et al. 2001)

mutants pour le récepteur *smo* c'est à dire en aval des ligands), *pitx2* n'est plus exprimé dans le mésoderme latéral. Mais dans les souris *pcht*^{-/-}, dont la mutation conduit à un gain de fonction de la voie Hh, *pitx2c* n'est exprimé que dans le mésoderme gauche (Figure 15-I). En plus de la dérégulation de *pitx2* dans les mutants de la voie Hh, l'expression de GDF-1 dans le nœud et celle de *crypto* dans la LPM sont perdues (Figure 15-II) (Zhang et al., 2001). La voie Hh est donc nécessaire pour initier l'expression de GDF-1 et *Crypto*, eux-mêmes essentiels à l'expression de *Nodal*.

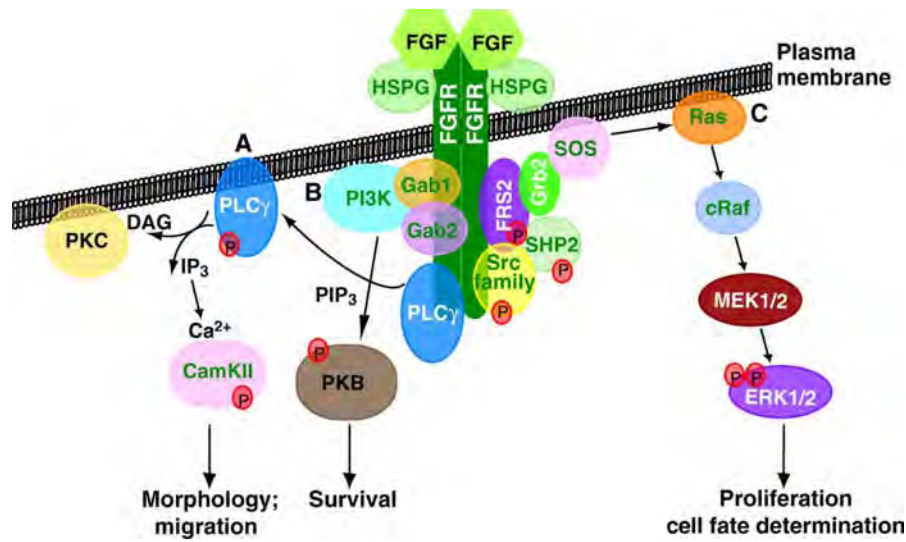
1.3.3. Rôle de la voie de signalisation FGF

Alors que les voies *Nodal* et HH déterminent l'identité gauche, la voie de signalisation FGF est décrite pour agir plutôt comme un déterminant de l'identité droite.

Les FGF (Fibroblast Growth Factor) sont des ligands extracellulaires qui se fixent sur les récepteurs FGFR à activité tyrosine-kinase. Les récepteurs se dimérisent ce qui déclenche la transphosphorylation d'un résidu tyrosine. Cette phosphorylation provoque l'activation de voies de signalisation cytoplasmiques telles que : Ras/Erk, Akt ou PKC (protéine kinase) (Figure 16-A).

Chez le poulet, *fgf8* est exprimé dans la partie postérieure droite du nœud de Hensen. L'expression ectopique de *fgf8* du côté gauche par implantation de billes provoque soit une inversion du sens de la boucle cardiaque soit une totale symétrisation du cœur. L'implantation de billes d'Activin étant capable d'activer la production ectopique de *Fgf8* dans le nœud, il semble que la voie Activin endogène soit responsable de l'induction de l'expression asymétrique de *fgf8* (Boettger et al., 1999). Bien que possédant des patrons d'expression mutuellement exclusifs, il ne semble pas que *shh* et *fgf* interagissent pour s'inhiber l'un l'autre. En revanche, l'implantation de billes de *fgf8* près du nœud induit une forte réduction voire une extinction de l'expression de *Nodal* à gauche. Si une telle bille est implantée près du nœud au moment de l'expression de *Nodal* dans le mésoderme latéral, malgré la distance entre nœud et LPM, l'expression de *Nodal* dans la LPM est tout de même abolie. *Fgf8* pourrait donc être responsable de l'absence d'expression de *Nodal* du côté droit de la ligne médiane.

A



B

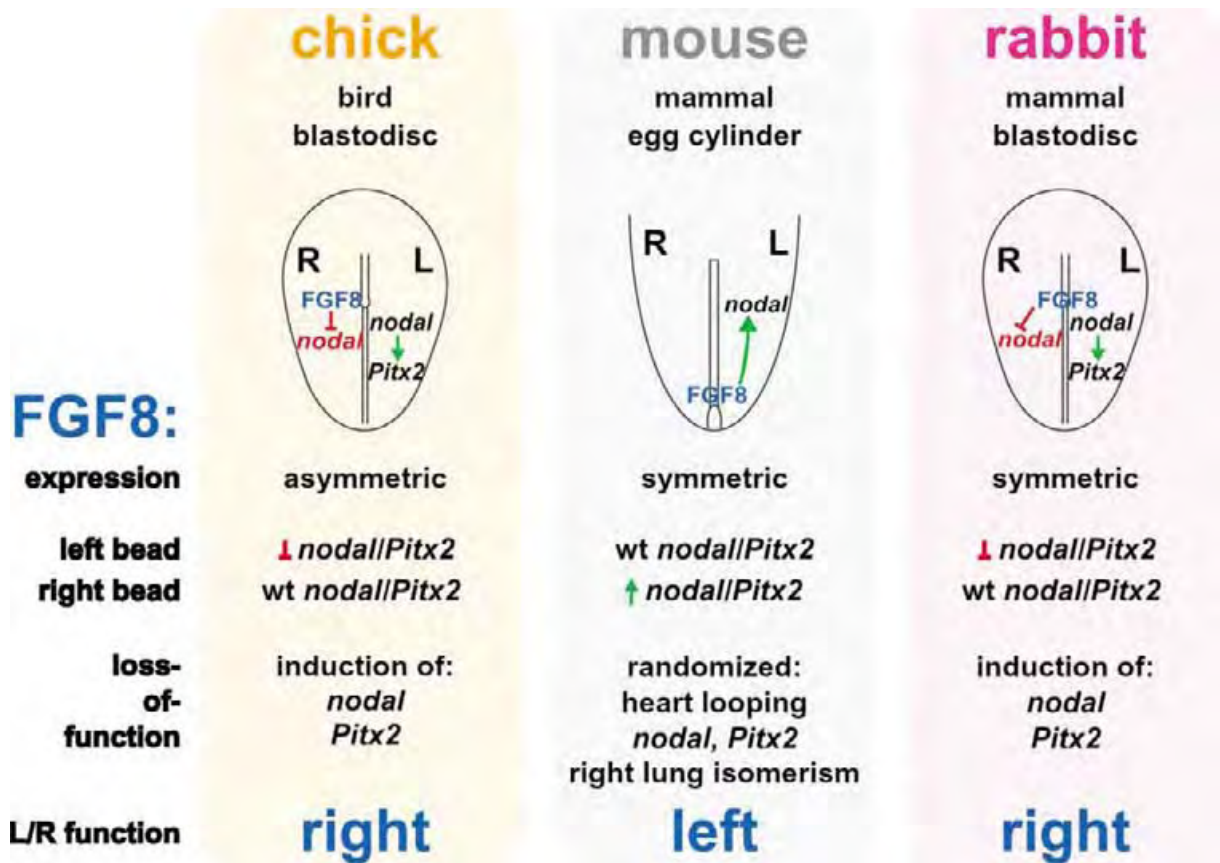


Figure 16 : Fonctionnement et rôle de la voie de signalisation Fgf dans la mise en place de l'asymétrie. A) La voie de signalisation Fgf est initiée par la liaison du ligand Fgf sur ses récepteurs qui vont se phosphoryler pour déclencher les différentes cascades de transduction intracellulaire : PKC, PI3k ou RAS (Dorey 2010).

B) Fonction de Fgf8 dans la formation de l'axe gauche droite chez les vertébrés et comparaison entre les différents contextes gain et perte de fonctions de FGF8. Chez le lapin et le poulet, FGF8 réprime la cascade Nodal à droite alors que chez la souris, FGF8 a plutôt une fonction de déterminant gauche et est requis pour l'induction de Nodal (Fisher et al., 2002).

Les souris hétérozygotes mutantes pour *Fgf8* (*fgf^{neo/-}*) présentent des défauts de l'axe gauche-droite notamment au niveau de la boucle cardiaque qui est anormale dans 49% des cas. Les mutants présentent également dans un grand nombre de cas un isomérisme de type droit des poumons. Chez les embryons mutants, l'expression est absente ou fortement diminuée et, à l'inverse, après implantation de bille de Fgf dans l'embryon, l'expression de Nodal est forcée dans les tissus environnant la bille. *Fgf8* permet donc l'induction de Nodal. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que *fgf8* serait chez la souris un déterminant de l'identité gauche contrairement à l'activité chez le poulet (Meyers and Martin, 1999).

Dans d'autres modèles, le mécanisme d'action est encore différent, pointant la faible conservation chez les vertébrés du mode d'action de FGF dans l'asymétrie gauche-droite. Chez le lapin, *fgf8* est exprimé symétriquement. Contrairement au mécanisme observé chez la souris, un gain de fonction de *fgf8* chez le lapin permet d'induire l'expression ectopique de Nodal au niveau du nœud. Par contre, lorsque le gain de fonction est réalisé plus tard dans le développement, *fgf8* induit l'inhibition de l'expression de Nodal dans le mésoderme latéral (Fischer et al., 2002).

Chez le poisson zèbre, la diminution de la dose de *fgf8* dans le mutant *acerebellar* (*ace*) induit également des anomalies au niveau des viscères : l'orientation du cœur et des intestins est aléatoire. Comme chez les autres modèles, la plupart des embryons mutants présentent une boucle du tube cardiaque soit inexistante soit inversée. Cependant, dans le mésoderme latéral, l'expression de Nodal est soit inversée soit bilatérale. La corrélation entre la perte de *fgf* et le patron d'expression de Nodal passe par l'action de la voie Fgf sur le nœud embryonnaire. Il a été montré que dans le mutant *fgf8^{-/-}* (*acerebellar*) ou dans le morphant *fgfr1*, la taille des cils portés par les cellules de la vésicule de Kupffer est réduite. Cela suggère que ces cils fonctionnent mal et qu'en conséquence l'expression de Nodal est bilatéralisée (Neugebauer et al., 2009). Chez le poisson zèbre, le rôle de *fgf4*, un autre ligand de la voie, a été étudié. Dans les embryons morphants pour *fgf4*, des défauts d'asymétrie sont décrits pour le cœur, le foie et le pancréas qui sont positionnés de façon aléatoire. Il semble que *fgf4* soit requis pour la ciliogenèse dans la vésicule de Kupffer mais également pour la latéralité de l'expression des gènes « gauches » comme *spw* ou *pitx2*. De plus, *fgf4* est nécessaire à l'expression de *lefty-1* dans la ligne latérale (Figure 16-B) (Yamauchi et al., 2009).

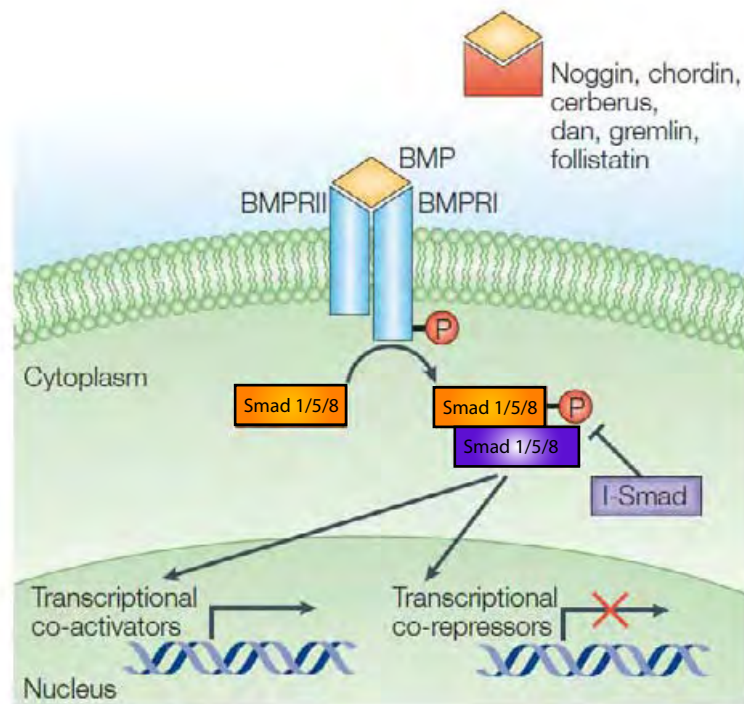


Figure 17 : Fonctionnement de la voie de signalisation BMP.

Le ligand BMP se fixe sur ses récepteurs qui vont se phosphoryler. Cette étape déclenche la phosphorylation des cofacteurs Smad1/5/8 qui vont recruter un autre facteur cytoplasmique Smad4. Ce complexe Smad est transloqué dans le noyau où il va permettre l'activation de la transcription de gènes cibles.

(D'après Liu 2005)

I.3.4. Rôle de la voie de signalisation BMP

La mise en place de l'asymétrie est un processus complexe et essentiel à la survie de l'individu. Elle est très finement régulée et elle implique de nombreuses voies de signalisation. En plus, des voies Nodal, HH et FGF, la voie de signalisation BMP (Bone Morphogenic Protein) prend part au processus. Les BMP appartiennent à la famille des TGF- β , comme Nodal et Activin. Comme Nodal, le ligand BMP se lie à des récepteurs sérine-thréonine kinase qui vont activer la transduction du signal dans la cellule via des cofacteurs Smad. Les récepteurs phosphorylent les Smad-1/5/8 qui seront, une fois liés au Smad-4, transloqués dans le noyau pour y activer la transcription des gènes cibles de la voie. La voie BMP possède de nombreux antagonistes comme *noggin*, *chordin*, *cerberus*, *dan*, *gremlin* et *folistatin* qui empêchent l'association du ligand aux récepteurs (Liu and Niswander, 2005) (Figure 17).

Chez le poulet, BMP4 est tout d'abord exprimé bilatéralement avec un renfort de l'expression du côté droit du nœud, puis son expression devient symétrique dans le mésoderme latéral (Monsoro-Burq and Le Douarin, 2000). Cependant, un inhibiteur de la voie BMP, *caronte* (*car*), qui est un homologue de *cerberus*, est exprimé à gauche dans le mésoderme paraxial. La voie de signalisation BMP est donc active seulement à droite. L'expression de *car* est initiée par la voie Shh car des billes de Shh sont capables d'induire l'expression ectopique de *car* (Yokouchi et al., 1999). Parallèlement, l'implantation de billes de *fgf8* induit la diminution de l'expression de *car*, suggérant que *fgf-8* permet d'inhiber *car* du côté droit et ainsi permettre l'activité de BMP à droite (Rodriguez Esteban et al., 1999). *Car*, quant à lui, régule l'expression asymétrique de gène gauche : il est capable d'induire l'expression de Nodal dans la LPM et en conséquence l'expression de *pitx2*. Mais Nodal est régulé séquentiellement par BMP lui-même : BMP est capable de réprimer l'expression de Nodal via la répression de *shh* au niveau du nœud entre les stades 5 et 6 du développement du poulet. Par contre, plus tard, vers les stades 7-8, BMP, qui est alors exprimé symétriquement, induit l'expression de Nodal à gauche. Cette activation de Nodal pourrait se faire par l'intermédiaire de CFC (crypto) (Figure 18-A). En effet, l'expression de CFC requiert le signal BMP.

Dans le modèle souris, *bmp-2* et *-4* sont exprimés symétriquement dans le mésoderme latéral (Fujiwara et al., 2002) et influencent également Nodal. Sans *bmp-4*, les embryons n'expriment pas ou faiblement Nodal. Cependant, dans ces embryons mutants, le nœud embryonnaire est plat, voire convexe, suggérant que l'effet observé dans la perte de BMP

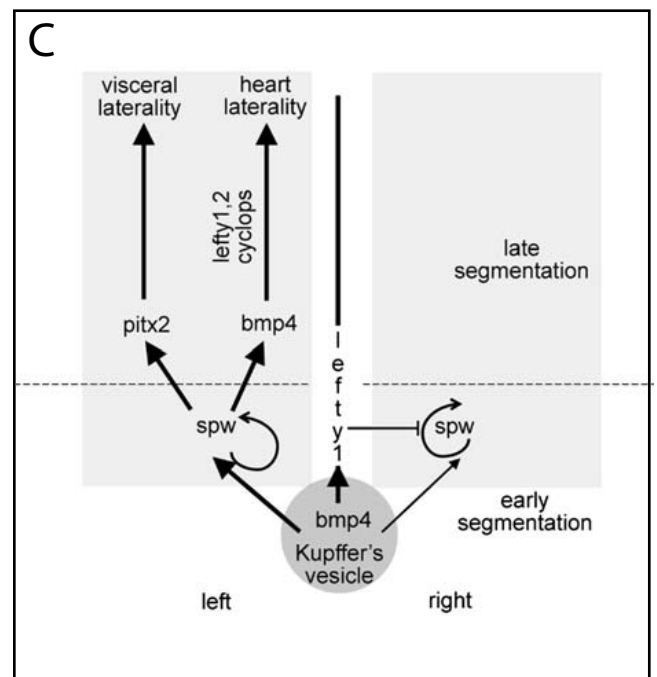
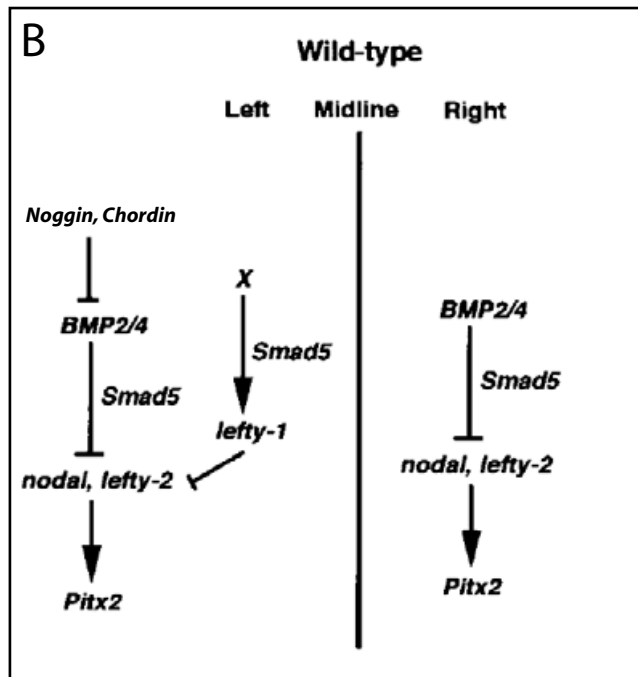
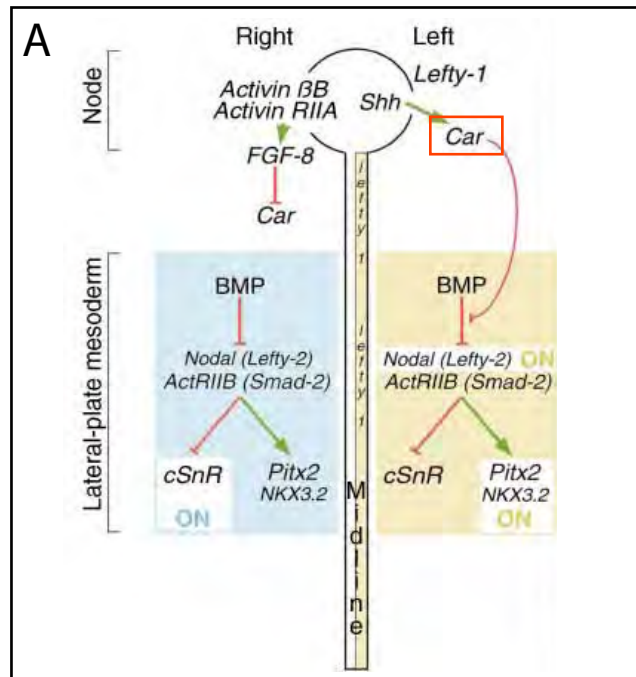


Figure 18 : Action de la voie de signalisation BMP chez les différents organismes modèles.

A) Chez le poulet, l'expression de Caronte est contrôlée par *shh* et *fgf8*. Du côté gauche, Caronte réprime la voie BMP et donc permet l'activité de la voie Nodal. (D'après Rodriguez-Esteban et al., 1999).

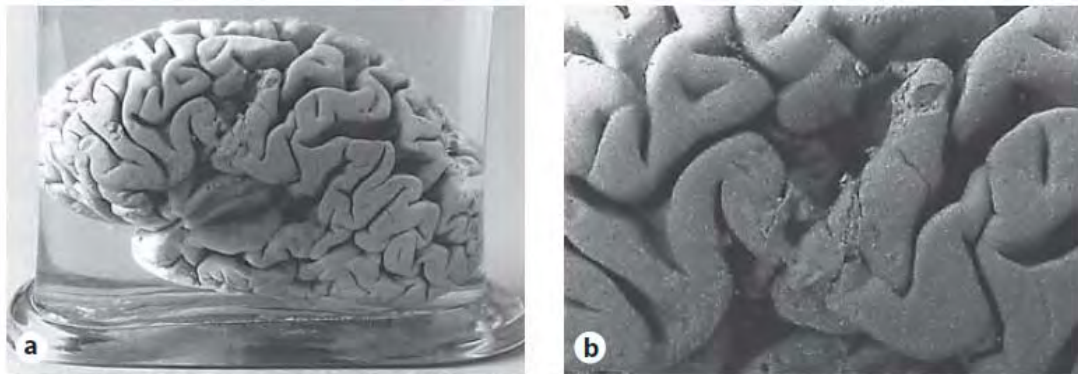
B) Chez la souris, Noggin et Chordin bloquent la voie BMP ce qui permet l'expression de Nodal à gauche. Dans le même temps, Smad5 permet l'expression de Lefty-1 pour créer une barrière de diffusion à Nodal au niveau de la ligne médiane. (Adapté d'après Chang et al., 2000).

C) Chez le poisson zèbre, *bmp-4* dans la vésicule de kupffer réprime l'expression de *spw* à droite. Dans le mésoderme latéral, *spw* induit l'expression de *bmp-4* qui impose la latéralité du coeur (D'après Chocron et al., 2007)

résulte d'un défaut de développement du nœud embryonnaire. Des expériences de déplétion de BMP spécifiquement dans la LPM, ont permis de confirmer que BMP réprime l'expression de Nodal (Mine et al., 2008). Par ailleurs, les antagonistes de la voie BMP, *noggin* et *chordin*, sont nécessaires à l'expression de Nodal : double mutant *nog*^{-/-} ; *chrd*^{-/-} où des défauts d'orientation de la boucle cardiaque sont observés, ne présente plus ou très faiblement d'expression de Nodal au niveau du nœud et dans la LPM. Dans le même temps, l'expression de BMP est accrue dans la région périnodale dans les doubles mutants murins. Les mutants *smad5*^{-/-} présentent une expression de Nodal normale et asymétrique au niveau du nœud embryonnaire mais bilatérale dans la LPM. *Pitx2* et *Lefty-2* sont également exprimés bilatéralement. Cependant, l'expression de *lefty-1* est abolie ce qui ne permet plus de créer une barrière étanche au niveau de la ligne médiane, empêchant l'expression de Nodal à droite. BMP régule directement l'expression de *lefty-1* indépendamment de Nodal (Figure 18-B) (Chang et al., 2000). Ce type de régulation de *lefty* a également été décrit chez le poisson zèbre (Smith et al., 2011). Ce dernier modèle a permis de pousser plus loin l'analyse du rôle de BMP dans l'asymétrie droite gauche du cœur ainsi que son interaction avec Nodal. Comme chez le poulet et la souris BMP régule l'asymétrie : BMP4 est requis pour réprimer l'expression de *spw* à droite de la vésicule de Kupffer puis il est requis pour imposer la latéralité du cœur en régulant *cyclops*, *lefty-1* et-2 (Figure 18-C) (Chocron et al., 2007). Le cœur du poisson zèbre se développe à partir de cellules du mésoderme latéral qui vont migrer et fusionner pour former le tube cardiaque. Alors que Nodal impose une latéralité à la migration des cellules cardiaques, BMP régule leur vitesse de migration. BMP influence négativement la migration des cellules cardiaques. Dans ce contexte, *spw* antagonise indirectement BMP (peut être par une compétition pour Smad4, cofacteur commun aux deux TGF-β) et la voie BMP est moins active à gauche (Veerkamp et al., 2013). De ce fait, les cellules de la partie gauche migrent rapidement et dans la partie droite, là où BMP est actif, plus lentement. Le paradoxe de cellules droites qui migrent vers la gauche sans être influencées par Nodal peut être résolu par des différences de vitesse de migration : les deux vitesses de migration vont permettre de transformer cette structure symétrique en forme de disque plat en un tube asymétrique (Lenhart et al., 2013).

L'asymétrie évidente des organes internes n'est pas la seule manifestation de l'asymétrie chez les vertébrés. En effet on retrouve de nombreuses asymétries au niveau du système nerveux.

A



B

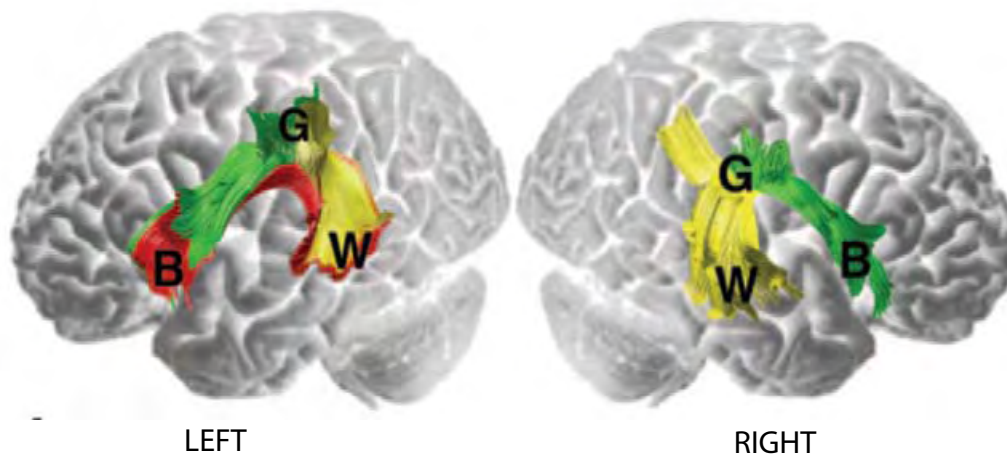


Figure 19: Latéralisation des aires du langage.

A) Vue latérale du cerveau de M. Lelong, un des patients aphasiques dont le cerveau endommagé a été étudié par Broca. Le zoom en (b) permet d'observer la lésion à l'origine de la perte de parole (d'après Pearce 2008).

B) Les connexions nerveuses entre les aires de Broca et Wernicke passent par l'aire de Geshwing. Dans l'hémisphère gauche, ces connexions sont plus nombreuses (en rouge). (d'après Catani 2007)

I.4. L'asymétrie gauche-droite neurale : mise en place et comportements latéralisés

L'organisation du cerveau humain a toujours été une question centrale en biologie. Des autopsies au XIX^{ème} sur des individus atteints de lésions cérébrales provoquant des aphasies (c'est-à-dire des difficultés de production et de compréhension du langage) ont permis d'une part de découvrir des aires spécialisées dans le traitement du langage et d'autre part de mettre en évidence que le langage est traité principalement dans l'hémisphère gauche (Figure 19-A). Aujourd'hui, les aires latéralisées du cortex cérébral de Broca et Wernicke impliquées respectivement dans la production et la compréhension des mots sont toujours au centre de l'intérêt des scientifiques. Un tractus de connections existant seulement à gauche passant de l'aire de Broca vers l'aire de Wernicke via une troisième aire, l'aire de Gershwins, a été mis en évidence chez l'homme (Figure 19-B) (Catani et al., 2007). Les asymétries neuro-anatomiques sous entendent l'existence d'asymétries comportementales. L'étude des asymétries et latéralités neurales ainsi que des comportements possiblement associés sont largement étudiés chez les organismes modèles.

I.4.1. Les asymétries neurales

L'asymétrie du cerveau a longtemps été considérée comme le propre des humains car certaines fonctions comme le langage n'avaient été décrites que chez l'homme. En fait, des asymétries au niveau des aires du cortex de traitement des sons ont également été retrouvées chez les singes. L'asymétrie neurale est également présente chez les invertébrés. L'étude de la mise en place des asymétries chez différents modèles animaux a permis de mettre en lumière l'influence de différents facteurs génétiques et environnementaux.

*I.4.1.a Influence des gènes : Asymétrie du système sensoriel de *Caenorhabditis elegans**

Chez le nématode *C. elegans*, le système nerveux comporte 302 neurones. Parmi ces derniers, deux neurones sensoriels percepteurs des odeurs sont situés dans une invagination de la cuticule appelée amphide. Un seul des deux neurones AWC (pour AmphidWing C) exprime le récepteur aux odeurs *str-2* et est désigné comme AWC^{ON}. L'autre, qui n'exprime pas ce récepteur, est appelé AWC^{OFF}. Dans 50% des cas, le neurone AWC^{ON} est placé à

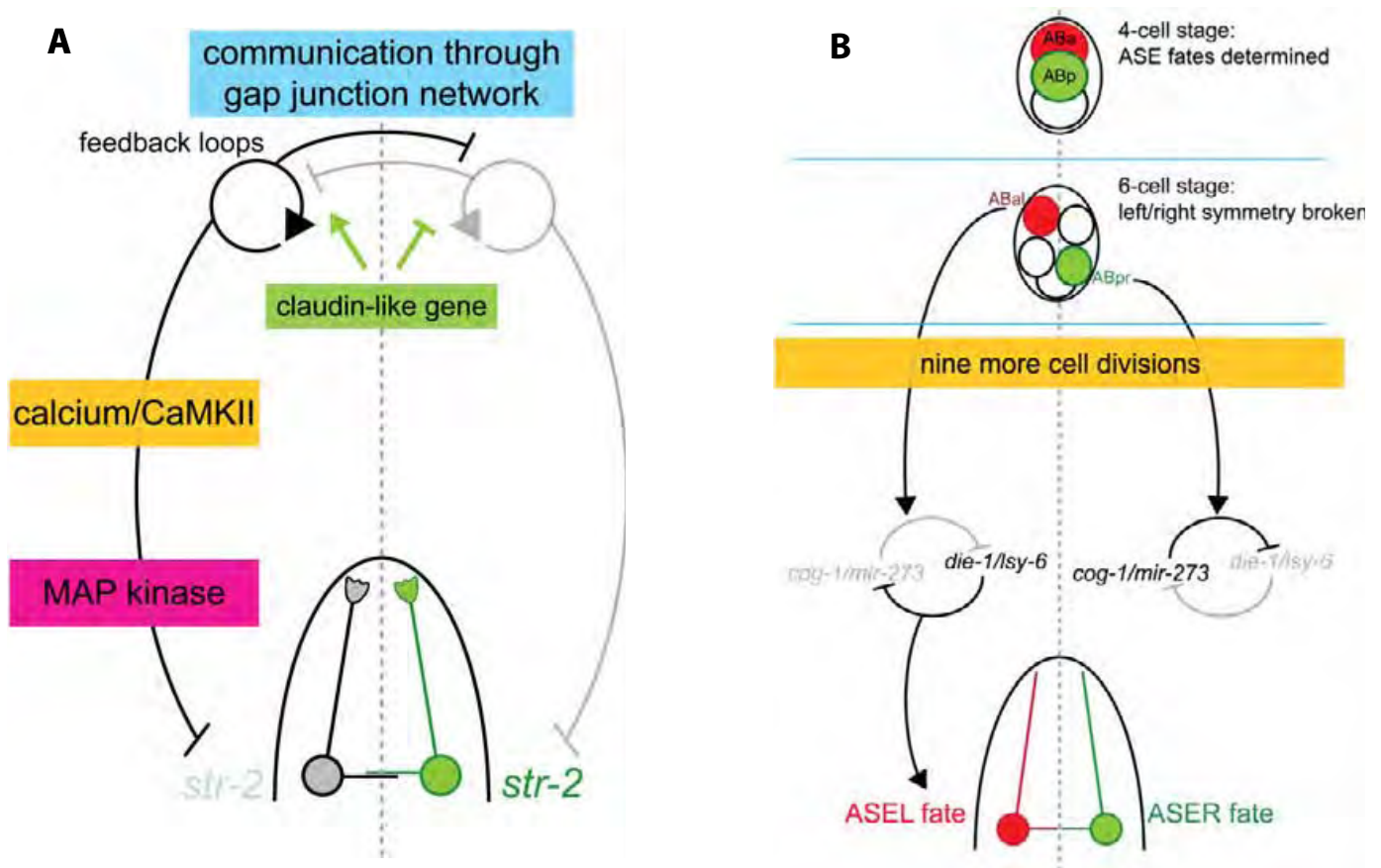


Figure 20 : Mise en place de l'asymétrie du système sensoriel chez *C. elegans*.

A) Modèle de régulation de l'asymétrie à latéralité aléatoire (neurones olfactifs AWC on et off)

B) Modèle de régulation de l'asymétrie à latéralité imposée (neurones ASEL et ASER senseurs du goût)

d'après (Sagasti, 2007)

gauche. Les neurones AWC sont issus de différents lignages de sorte que pour créer l'asymétrie d'expression de *str-2*, les deux cellules doivent communiquer entre elles. Elles peuvent s'envoyer des informations grâce à leurs axones que chacune d'elle projette vers la ligne médiane et qui se contactent à cet endroit. La réalisation de cribles génétiques a permis de mettre en évidence l'action de la signalisation calcique à travers des mutants pour le gène *claudin*. En effet, ces mutants expriment *str-2* symétriquement dans les deux neurones AWC (Vanhoven et al., 2006). Le mécanisme d'action a pu être finement disséqué. L'entrée de calcium active des calmodulines (CaMKII, pour calcium/calmodulin-dependant protein kinase) qui déclenchent l'activité de la voie MAP kinase pour permettre la répression de *str-2* (Sagasti et al., 2001). C'est donc la puissance du signal calcique dans l'une des deux cellules, dont la latéralité est aléatoire, qui permet de mettre en place l'asymétrie (Figure 20-A).

Cette asymétrie à latéralité stochastique s'oppose à la latéralité imposée retrouvée chez les neurones responsables de la perception du goût. Ces neurones ASE (Amphid Exposed Cells) présents eux aussi dans l'amphide sont nommés ASEL (Amphid Exposed Cells Left) à gauche et ASER (Amphid Exposed Cells right) à droite. Ils expriment chacun, invariablement, une combinaison propre de gènes. Par exemple, la *guanlyl cyclase-7* (*gcy-7*) est toujours exprimée dans le neurone gauche et *gcy-5* dans le droit, de sorte que chaque neurone est spécialisé pour percevoir un type particulier d'odeur. La mise en place de cette asymétrie ne repose pas sur la communication entre deux cellules pour établir un type d'inhibition latérale. Au départ, les deux cellules expriment toutes deux les mêmes gènes. C'est grâce à l'action de micro-RNA et de facteurs de transcription que les gènes exprimés sont différents dans les deux neurones. En effet, dans ASEL le miRNA *lsy-6* inhibe l'expression de facteur de transcription *cog-1* ce qui empêche l'activation de *mir-273*. Dans ASER, la situation est inverse : c'est *mir-273* qui bloque l'expression de *lsy-6* et du facteur de transcription *die-1*. Les facteurs de transcription spécifiquement activés par cette boucle d'inhibition, permettront à chaque neurone de finalement acquérir son identité *via* l'expression d'autres facteurs de transcription. Cependant, l'activation des boucles de contrôle miRNA/facteur de transcription est elle-même asymétrique et latéralisée. Il semble que l'asymétrie initiale soit liée au lignage des deux cellules : même si leur lignage est différent, la cellule vouée à devenir ASEL sera toujours issue du même lignage. Ceci met en exergue que l'asymétrie des neurones ASE se fait très tôt au cours du développement (Figure 20-B).

Ces différences entre les deux neurones senseurs des odeurs ont une influence sur le comportement du vers. Il est connu qu'une augmentation du niveau de calcium augmente les

probabilités d'une locomotion en avant alors qu'une diminution augmente la probabilité que le vers tourne. Des études comportementales ont montré que lorsque le neurone ASEL est endommagé, le vers montre un déficit dans sa locomotion vers l'avant. En revanche, lorsque c'est le neurone ASER qui est endommagé, l'individu ne tourne plus (Suzuki et al., 2008). L'activité d'ASEL et ASER permettent l'exécution d'un programme moteur fait d'avancées en ligne droite et de virages pour produire un comportement chimiotactique approprié.

Outre le fait que le développement asymétrique du système nerveux subit l'influence des gènes, l'environnement est également capable d'agir sur l'orientation de l'asymétrie.

I.4.1.b. Influence de l'environnement : Latéralisation du système visuel chez les oiseaux.

La préférence d'un œil chez le poulet pour chercher sa nourriture a été décrite depuis les années 1980 (Rogers, 1982). Rapidement, une corrélation a été établie entre latéralité de l'utilisation de l'œil et exposition à la lumière de l'embryon durant la période d'incubation dans l'œuf. En effet, l'embryon de poulet adopte une position stéréotypée dans l'œuf : l'œil gauche est en contact avec le vitellus ce qui empêche la lumière de pénétrer et d'atteindre l'œil. L'œil droit est du côté de la coquille et donc exposé à la lumière de l'environnement. Le circuit des projections des fibres nerveuses optiques passe par le tectum optique puis font relais au niveau du noyau géniculé latéral (NGL) d'où d'autres projections axonales atteignent le thalamus. Les embryons brièvement exposés à la lumière avant l'éclosion présentent des asymétries au niveau du NGL : le NGL gauche développe plus de connections (ipsilatérale et controlatérale) que le droit (Koshiba et al., 2003). Compte tenu des projections controlatérales, cela suggère une plus grande influence de l'œil droit. Ces observations sont corrélées à des comportements latéralisés notamment la propension à utiliser l'œil droit pour discriminer les grains et les cailloux au sol alors que l'œil gauche est dédié à la veille contre les prédateurs (Rogers et al., 2007). Les embryons maintenus dans le noir ne présentent ni asymétries neuro-anatomiques ni asymétries comportementales.

La réponse à la lumière est elle-même influencée par les hormones stéroïdes et corticoïdes : les individus traités à la testostérone lors de l'embryogenèse attaquent plus facilement lorsqu'ils voient le stimulus avec l'œil gauche. Par ailleurs, les embryons traités à la corticostérone ne présentent pas de biais dans l'orientation de l'asymétrie déterminée par la

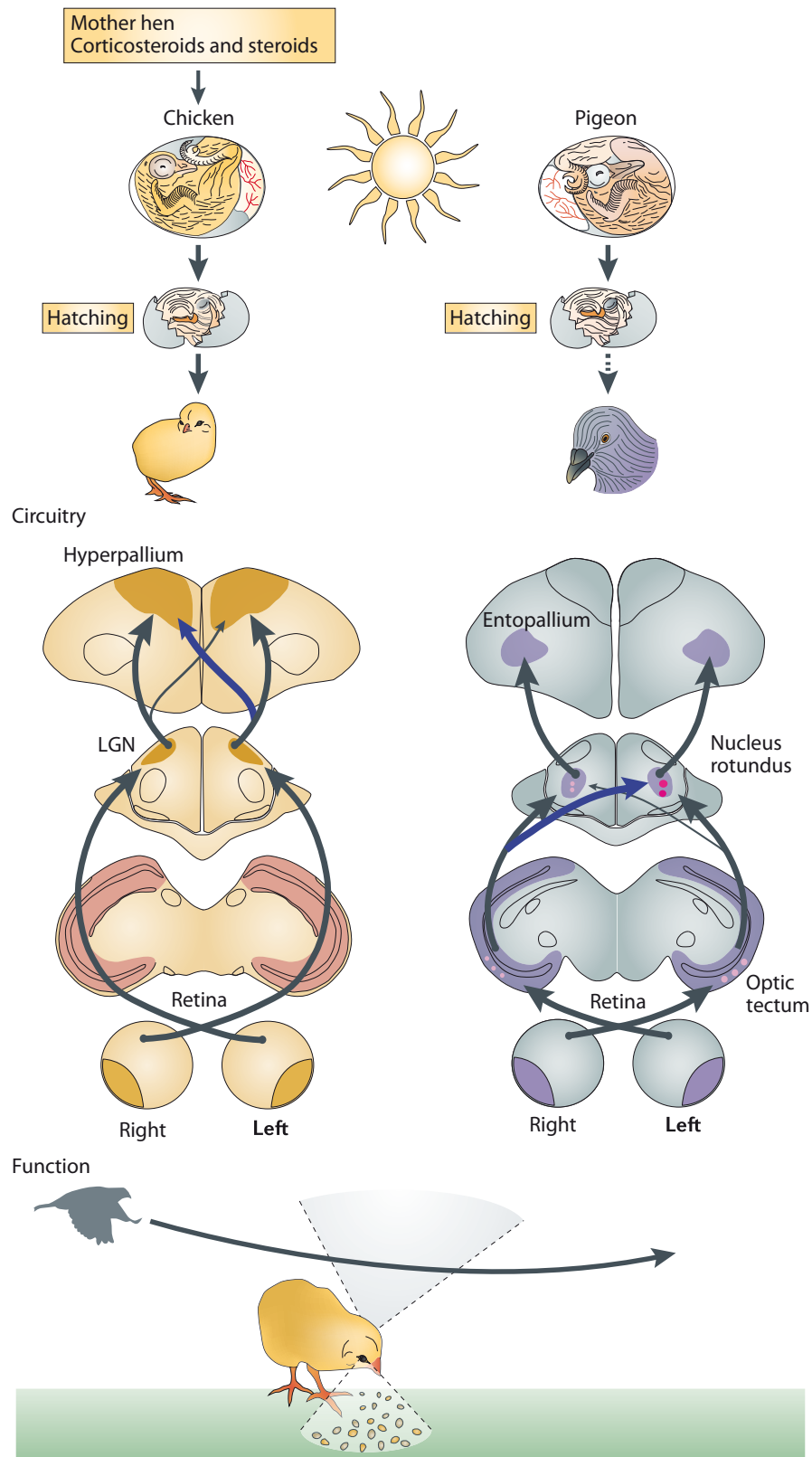


Figure 21: Latéralisation induite par la lumière chez les oiseaux.

L'exposition à la lumière avant l'éclosion induit une asymétrie dans les connexions du système visuel. Ces asymétries peuvent être également modulées par les hormones. Alors que les poulet développent une asymétrie au niveau des projections thalamo-fugales, les pigeons développent une asymétrie au niveau des projections tecto-fugales.

LGN = Lateral geniculate nucleus.

(Concha et al., 2012)

répartition des neurones (Rogers and Deng, 2005). L'état hormonal de la mère jouerait donc un rôle dans l'asymétrie développée chez les petits.

Des études semblables ont été menées chez d'autres oiseaux tel que le pigeon et il semble que l'influence de la lumière soit conservée chez les espèces aviaires bien que le circuit des projections soit différent : le nerf optique projette contralatéralement sur le tectum optique ou le circuit se poursuit contra- et ipsilatéralement sur le *nucleus rotundus* et enfin contralatéralement sur l'entopallium au niveau du thalamus. Plusieurs asymétries sont présentes dans ce circuit : premièrement, les projections contralatérales du tectum optique vers le nucleus rotundus sont plus nombreuses à droite. Deuxièmement, les soma des neurones du tectum sont plus grands à gauche (Gunturkun, 1997). La privation de lumière ou le changement de l'œil exposé à la lumière provoque, comme chez le poulet, un changement de la direction de l'asymétrie des projections. Même si les circuits de projections neuronales sont différents chez pigeon et poulet, l'influence des signaux extérieurs engendre le même type de réponses vis à vis de l'asymétrie (Figure 21).

I.4.1.c. Influence du genre sur l'asymétrie :

De nombreuses asymétries varient en fonction du genre : chez le poulet, par exemple, un changement dans le niveau des hormones stéroïdes et de la corticostérone de la mère module l'influence de la lumière sur l'asymétrie du tractus visuel. Cette influence du sexe est retrouvée dans d'autres tissus et dans d'autres modèles animaux : chez le rat, l'hippocampe, structure qui régule plusieurs processus dont la mémoire ou l'apprentissage, est plus épais à droite qu'à gauche chez les mâles et inversement chez les femelles (Diamond et al., 1983). Cette différence entre les genres n'a pas pu encore être reliée à une différence de comportement entre mâle et femelle. Chez l'humain, le cerveau possède des asymétries différentes entre hommes et femmes. Des études d'imagerie fonctionnelle ont pu corréliser asymétries, comportements et latéralisation. 60% des gauchers possèdent une aire corticale associée au contrôle des mouvements de la main plus étendue à droite qu'à gauche. Aucune différence n'a pu être mise en évidence chez les femmes. Cela suggère l'existence de différences dans l'organisation des mouvements au niveau du cortex (Amunts et al., 2000).

I.4.2. Asymétries neurales latéralisées : avantage ou inconvénient ?

L'asymétrie est façonnée par différentes influences : par l'influence de gènes, des signaux environnementaux, des hormones, mais la question de l'utilité de telles asymétries et de la latéralisation peut être posée. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : premièrement, l'asymétrie du système nerveux permettrait d'éviter la duplication de fonction au niveau des deux hémisphères et de ce fait « économiser » du tissu nerveux qui pourrait alors servir à d'autres fonctions. Deuxièmement, la latéralisation permettrait d'éviter une initiation simultanée de deux réponses. Enfin, la latéralisation serait un moyen d'augmenter la capacité d'un organisme à accomplir deux tâches à la fois. C'est cette dernière hypothèse qui est retenue pour expliquer la capacité des poulets à chercher la nourriture de l'œil gauche, en distinguant les cailloux des graines, tout en surveillant avec l'autre œil l'arrivée de prédateurs.

A l'échelle de l'individu, l'optimisation du tissu neural et l'augmentation de l'efficacité du cerveau n'expliquent pas pourquoi l'orientation de l'asymétrie soit aussi fortement conservée au sein d'une population. Tout comme la grande conservation du sens d'enroulement de la coquille chez les espèces d'escargots, la forte conservation de l'orientation de l'asymétrie (ou latéralité) est retrouvée chez les bancs de poissons. Si la latéralité est conservée au sein de l'espèce, mais que l'individu vit seul, alors le prédateur pourrait apprendre le comportement latéralisé lié à l'asymétrie et en tirer avantage. Au cours de l'évolution, certains prédateurs adoptent des comportements latéralisés et développent des asymétries physiques pour s'adapter à l'asymétrie de leurs proies : c'est le cas, pour les serpents, *Pareas iwasakii*, dont les mâchoires sont adaptées pour manger préférentiellement des escargots dont l'enroulement de la coquille est dextre (Hoso et al., 2007).

Mais au niveau d'une population d'une espèce qui vit en groupe, l'avantage d'une latéralité commune pourrait s'expliquer plus facilement : chez les poissons grégaires qui forment des bancs, une latéralité commune pourrait expliquer l'extraordinaire coordination qui règne au sein d'un groupe. Dans les bancs, chaque individu augmente sa valeur adaptative (ou « fitness ») en restant dans le banc. Une modélisation informatique a permis de mettre en évidence qu'une population qui contient des individus gauchers ou droitiers en proportions inégales peut être évolutivement stable si le fait d'être latéralisé a des coûts moins importants que les bénéfices rapportés. En effet, dans le cas d'une population latéralisée, les proies ont un avantage à rester en groupe (bénéfices) mais cette situation permet aux prédateurs d'anticiper leur réponse (coût) (Ghirlanda and Vallortigara, 2004). Par ailleurs, le mode de vie non

grégaire des poissons est plus fréquemment associé à une latéralité non biaisée au sein de la population. Cette observation soutient que la conservation de la latéralité des asymétries donne l'avantage aux espèces grégaires (Bisazza et al., 2000).

C'est finalement chez l'humain que l'existence d'avantages dus aux comportements latéralisés est plus difficile à étayer. Il a été décrit depuis longtemps l'utilisation préférentielle d'une main et le fait que la proportion d'individus gauchers est plus faible. Malgré cela, 37% des droitiers et 57% des gauchers utilisent leur œil gauche comme œil directeur (McManus et al., 1999). Cette hétérogénéité dans les comportements latéralisés est troublante. Cependant, chez l'homme, la composante sociale peut entrer en ligne de compte. En effet, les conventions sociales imposent d'échanger une poignée de main avec la main droite et ont longtemps banni la main gauche pour écrire (Corballis, 2009). La pression sociale ne peut pas imposer l'asymétrie du comportement mais pourrait en théorie influencer sur sa latéralisation. Certaines études ont montré que les gauchers étaient avantagés dans certains sports individuels comme le tennis ou le baseball (Raymond et al., 1996) mais cet avantage est probablement simplement lié au fait que les gauchers sont peu nombreux au sein de la population et avantagés par un simple « effet de surprise ». Des études empiriques lient le fait d'être gaucher à des aptitudes particulières pour par exemple jouer de la guitare (Christman, 2009). L'explication la plus simple pour soutenir la latéralisation neurale chez l'humain est que le grand nombre de tâches à accomplir et d'informations doivent être traités simultanément et dans un volume neural limité.

Chez l'humain, il est clair que des défauts d'asymétries et/ou de la latéralisation du cerveau sont liés à certaines pathologies comme l'autisme. Les troubles du spectre autistique (TSA ou ASD pour autistic spectrum disorder) affectent 1 enfant sur 110. L'un des composants central des troubles autistiques est la difficulté à parler et à communiquer. Des études ont pu corréler la latéralisation de l'utilisation préférentielle d'une main avec l'historique de l'acquisition du langage. Il a été mis en évidence que les enfants diagnostiqués autistes avec des désordres d'acquisition du langage sont peu latéralisés en comparaison à des sujets autistes (ou non) dont l'acquisition du langage s'est faite normalement au cours de la petite enfance (Escalante-Mead et al., 2003). Les autistes non verbaux montrent une structure cérébrale différente : le *faciculus arcuate*, principal tractus de fibres nerveuses reliée au langage, a une asymétrie dont la latéralité est inversée par rapport aux sujets sains. Cette organisation anormale sous tend donc des difficultés d'acquisition du langage (Wan et al., 2012). L'imagerie à résonance magnétique (IRM) a permis de montrer une perte de

l'asymétrie dans les cerveaux d'autistes ou de patients atteints de désordre du langage. Il semble donc que l'asymétrie et la latéralité soient liées aux troubles autistiques (Herbert et al., 2005). Cependant, cette réorganisation des aires cérébrales peut être soit une cause soit une conséquence du TSA.

La latéralisation des aires du langage chez l'homme est aussi altérée chez les patients schizophrènes. L'imagerie fonctionnelle (fMRI pour functional magnetic resonance imagery) permet de visualiser les aires du cerveau actives grâce à l'afflux de sang dans cette zone. Chez les individus sains, les aires de Brodmann 44 et 45, qui font partie de l'aire de Broca, sont actives dans l'hémisphère gauche. Chez les individus schizophrènes ou chez les individus où le risque de schizophrénie est élevé, l'activation de ces aires est bilatérale (Li et al., 2007).

L'asymétrie et la latéralisation des structures cérébrales sont essentielles à une fonctionnalité correcte du cerveau. Chez l'homme, le grand nombre de structures neurales ainsi que la complexité des comportements associés rend quasi impossible une analyse partant du niveau moléculaire jusqu'aux fonctions latéralisées. Aussi, depuis plus d'une décennie, le poisson zèbre émerge comme un modèle fort pour étudier dans son ensemble la mise en place des asymétries et de la latéralisation des structures neurales.

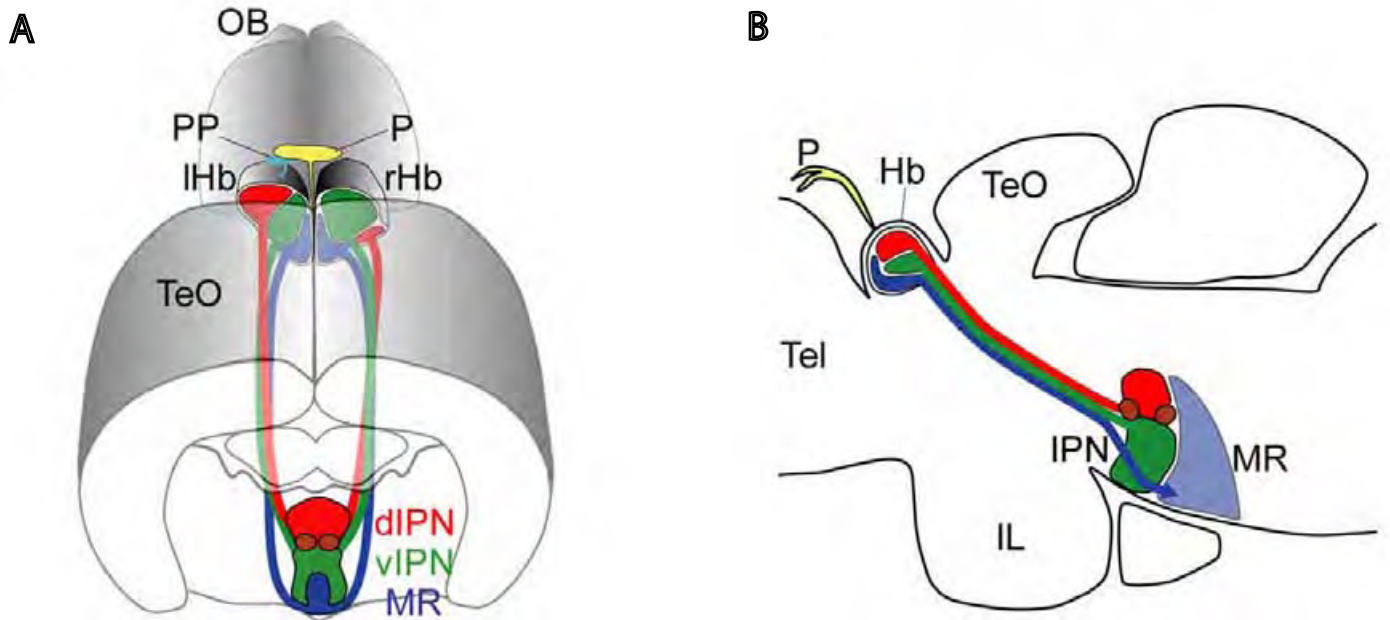


Figure 22 : L'épithalamus.

A) Vue dorsale de l'épithalamus du poisson zèbre.

B) Vue latérale.

P= Glande pinéale; PP= Glande parapinéale; OB = Bulbes olfactifs; lHb = Habenula gauche ; rHb = Habenula droite; TeO = Tectum optique; dIPN = Noyau interpedonculaire dorsal; vIPN = Noyau interpedonculaire ventral; MR = Raphé; Tel = Télencéphale (D'après Amo 2010).

II) L'ASYMETRIE GAUCHE DROITE DE L'EPITHALAMUS DU POISSON

ZEBRE

Chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, une structure neurale asymétrique, l'épithalamus, permet d'aborder la question de la mise en place de l'asymétrie. En effet, de nombreuses asymétries sont présentes tant au plan neuro-anatomique que moléculaire.

II.1. L'épithalamus

L'épithalamus appartient au diencephale et est situé dans la partie dorsale du cerveau, juste sous l'épiderme. A l'origine, cette structure a été décrite comme l'une des subdivisions du diencephale située au-dessus (épi) du thalamus. Elle est retrouvée chez tous les vertébrés (Concha 2001) et est constituée par deux structures principales (Figure 22):

- le **complexe pinéal** composé de la **glande pinéale** de la **glande parapinéale** ;
- l'**habenulae** composée de deux noyaux situés de part et d'autre de la ligne médiane.

Anatomiquement, la glande pinéale forme une évagination du diencephale au-dessus du troisième ventricule. Elle est connue essentiellement pour son rôle dans la régulation des rythmes circadiens et est composée de deux principaux types de neurones : les photorécepteurs et les neurones de projections (Sapede et Cau, 2013, in press).

Alors que la glande pinéale est retrouvée chez tous les vertébrés, la glande parapinéale n'est présente que chez les amphibiens, les lézards et certains poissons (Concha and Wilson, 2001). La glande parapinéale est une petite structure, d'une vingtaine de cellules dont la fonction reste encore inconnue.

Précocement, entre 20 et 24hpf, les progéniteurs des glandes pinéale et parapinéale sont regroupés dans un même territoire marqué par le facteur de transcription *floating head* (*flh*). Il a été montré que la glande parapinéale émerge du tiers antérieur de ce territoire présomptif. Malgré le fait que la glande parapinéale soit issue d'un territoire localisé sur la ligne médiane, elle va migrer vers la gauche à partir de 28hpf et envoyer des projections ipsilatéralement sur le noyau habénulaire à 35hpf. La position de la parapinéale constitue donc une asymétrie neuroanatomique évidente.

Les noyaux habénulaires sont situés sur les bords du troisième ventricule en antérieur de la commissure postérieure. Même si l'habenulae est une structure hautement conservée et présente chez tous les vertébrés, son organisation et sa composition moléculaire diffèrent en fonction des espèces. Chez le poisson zèbre, chaque noyau est divisé en plusieurs parties : une dorsale et une ventrale. L'habenulae dorsale est elle-même subdivisée en une partie médiale (dorso-médiale) proche de la ligne médiane et une partie latérale (dorso-latérale). Récemment, l'habenulae ventrale du poisson zèbre a été reconnue comme homologue de l'habenulae latérale chez les mammifères grâce à l'étude de la connectivité et des caractéristiques moléculaires (Amo et al., 2010).

Les habenulae vont présenter à la fois des asymétries moléculaires, dans la répartition de marqueurs, et des asymétries de connectivités. En effet, l'habenulae est une structure relais entre le télencéphale et le noyau interpedonculaire (Interpeduncular Nucleus ou IPN) situé dans le cerveau moyen et le raphé dans le cerveau postérieur. Les connexions axonales passent via le *fasciculus retroflexus* (aussi connu sous le nom de tractus habenulo-interpedonculaire). Les projections axonales qui émanent de l'habenulae dorsale gauche se projettent préférentiellement sur la partie dorsale de l'IPN alors que les axones de l'habenulae dorsale droite se projettent plutôt en ventral de l'IPN. L'habenulae ventrale, quant à elle, projette ses axones sur le raphé où aucune asymétrie n'a encore été mise en évidence.

Les différentes asymétries présentes dans l'épithalamus vont être mises en place au niveau moléculaire et neuro-anatomique pour finalement mettre en œuvre des fonctions latéralisées.

II.2. Rupture de la symétrie et mise en place de la première asymétrie

II.2.1. Nodal : premier marqueur de l'asymétrie épithalamique

La première asymétrie détectée dans l'épithalamus est celle de l'expression de Nodal dans la partie gauche du territoire présomptif entre 18 et 20hpf : le ligand *cyclops* est exprimé dans la partie antérieure gauche du territoire marqué par *flh*. Les autres orthologues du ligand Nodal (*southpaw* et *squint*) ne sont pas présents dans l'épithalamus. D'autres composants de la voie de signalisation tels qu'*oep* sont eux exprimés bilatéralement. L'expression unilatérale

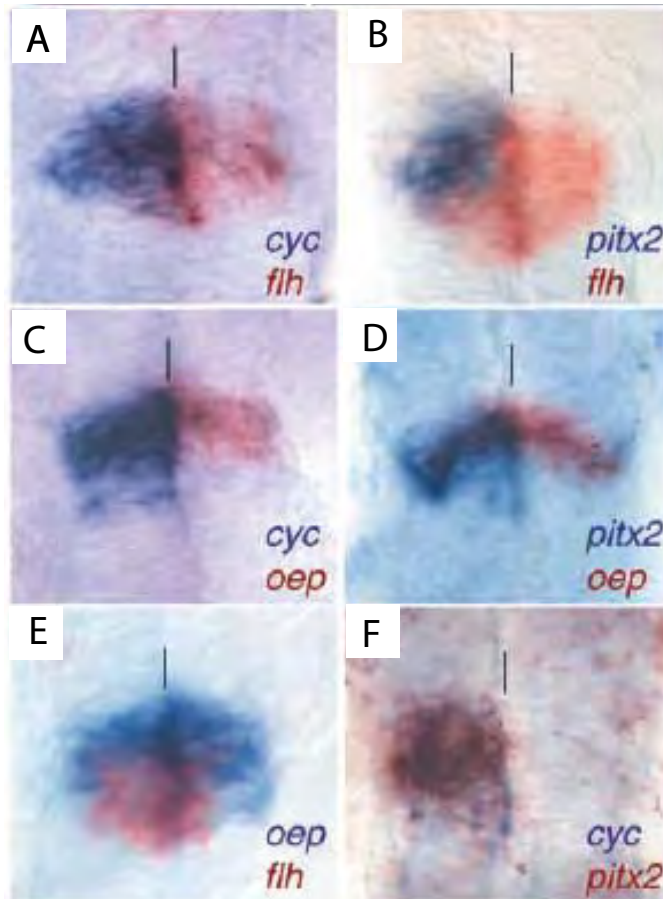


Figure 23 : Expression des composants de la voie Nodal dans l'épithalamus du poisson zèbre
 Vues dorsales de l'épithalamus du poisson zèbre âgés de 22 à 25 somites (entre 21 et 22hpf).
 A) *floating head* (*flh*) est exprimé dans tout le territoire de l'épithalamus précoce alors que *cyclops* n'est exprimé qu'à gauche.
 B) *pitx2c* occupe le quart antérieur gauche du territoire.
 C) *cyclops* est exprimé plus largement qu'*oep* à gauche. *oep* est exprimé bilatéralement.
 D) *pitx2c* et *oep* ont des patron d'expression qui se recouvrent à gauche.
 E) *oep* est exprimé bilatéralement dans la partie antérieure de l'épithalamus.
 F) *cyc* et *pitx2* s'expriment dans le même domaine.
 (D'après Liang et al., 2000)

des gènes cibles dont *pitx2c* et *lefty-1* atteste de l'activité de la voie seulement à gauche (Figure 23) (Liang et al., 2000).

Comme la voie de signalisation Nodal est active unilatéralement dans l'épithalamus, un autre mécanisme, en amont, doit initier cette asymétrie. Malgré le fait que *spaw* ne soit pas exprimé dans le système nerveux central, la perte de fonction de *spaw* dans la LPM après injection de morpholino, a un effet drastique sur l'épithalamus : l'expression de tous les acteurs de la voie Nodal (*cyclop*, *lefty* et *pitx2c*) est perdue. Il semble donc que l'activité Nodal dans le mésoderme latéral à 10hpf soit nécessaire à l'expression unilatérale de Nodal dans l'épithalamus à 18hpf (Long et al., 2003). Un relais d'activation de la voie Nodal sur elle-même du nœud embryonnaire à l'épithalamus via le mésoderme latéral est donc nécessaire.

Concha et al. ont décrit que la perte d'activité de la voie Nodal dans le mutant du ligand *cyc*^{-/-} au lieu d'induire une abolition de l'expression des gènes cibles de la voie, induisait en fait une expression bilatérale *pitx2c* dans le diencephale à 22hpf (Concha et al., 2000). Ce phénotype surprenant est sûrement dû à des défauts de formation des tissus de la ligne médiane. En revanche et en toute logique, la perte totale de la voie Nodal via la mutation du co-récepteur *oep* conduit à une forte diminution de l'expression de *cyc* et *pitx2c* dans l'épithalamus. Cependant, l'injection d'ARNm *oep* dans des embryons *oep*^{-/-} (MZ*oep*) ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage et l'expression de *cyc* et *pitx2* devient bilatérale. Par ailleurs, l'injection de morpholino contre *notail*, qui semble abaisser la barrière gauche-droite située sur la ligne médiane, permet également de rendre l'activité de nodal bilatérale et symétrique (Liang et al., 2000). La perturbation de la barrière de diffusion située sur la ligne médiane a donc des conséquences directes sur l'unilatéralité de la voie Nodal dans l'épithalamus. Pour étayer cette observation, des ablations de la ligne médiane par extraction du territoire durant la gastrulation ont été réalisées. Les embryons dont la ligne médiane a été retirée présentent une expression bilatérale de *cyc* et *pitx2c*. Ces résultats confirment l'importance d'une barrière médiane pour créer l'asymétrie de la voie Nodal dans l'épithalamus à 18hpf.

Ce mécanisme commun, qui implique l'expression de *southpaw* dans le mésoderme latéral explique pourquoi la latéralité des asymétries viscérales et neurales sont en général coordonnées.

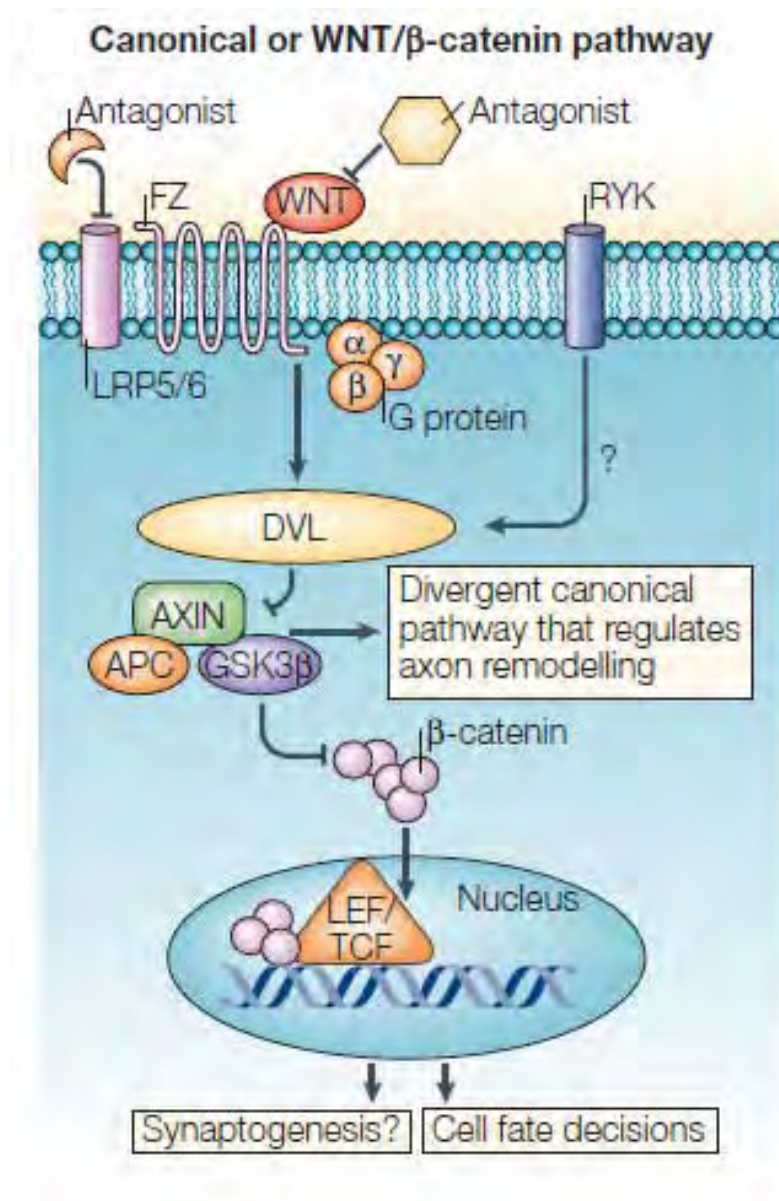


Figure 24 : Voie de signalisation Wnt.

La fixation du ligand Wnt sur son récepteur Frizzled permet l'activation de Dishevelled (DVL) qui désassemble un complexe de protéines contenant Axin, APC (Adenomatosis Polysis Coli) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3). L'activation de la voie permet l'inhibition de GSK3 qui ne peut pas dégrader la bêta-caténine dans le cytoplasme. Cette dernière est alors transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles. (D'après Ciani and Salinas, 2000)

II.2.2. Rôle de la voie Wnt

Parallèlement à l'action de *spw*, la voie Wnt contribue à l'établissement de l'expression de Nodal dans l'épithalamus. Les protéines Wnt sont des glycoprotéines sécrétées qui se lient à des récepteurs transmembranaires appelés Frizzled (FZ) qui sont des protéines à sept domaines transmembranaires. Dans la voie canonique, le complexe *wnt-fz* active *dishevelled* (DVL) qui désassemble un complexe de protéine contenant axin, APC (Adenomatosis Polysis Coli) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3). Lorsque la voie est inactive, le complexe contenant GSK3 phosphoryle la β -caténine, conduisant ainsi à sa dégradation. En revanche, l'activation de la voie permet l'inhibition de GSK3 qui conduit à une augmentation du niveau de β -caténine dans le cytoplasme. Cette dernière est alors transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles (Figure 24). (Ciani and Salinas, 2005).

Les mutants *masterblind* (*mb1*) portent une mutation dans le gène *axin1*, qui conduit donc une sur-activation de la voie Wnt car la β -caténine n'est pas dégradée. Dans ce contexte, il a été montré que les embryons mutants présentaient une activation bilatérale de la voie Nodal et donc une expression bilatérale des gènes associés à cette voie tels que *cyc*, *lft* et *pitx2*. (Carl et al., 2007).

Chez les individus sauvages, l'action de *spw* est nécessaire pour activer l'expression de Nodal dans l'épithalamus. Chez les individus mutants *mb1* dans lesquels un morpholino contre *spw* a été injecté, *pitx2c* est toujours exprimé. L'action de Wnt est donc épistatique sur celle de *spw* dans la mise en place de la voie Nodal dans l'épithalamus. On peut alors poser l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation Wnt impose une répression sur l'expression de Nodal dans l'épithalamus de façon bilatérale. *spw* serait alors nécessaire pour lever cette répression seulement à gauche permettant ainsi l'expression de nodal unilatéralement (Figure 25).

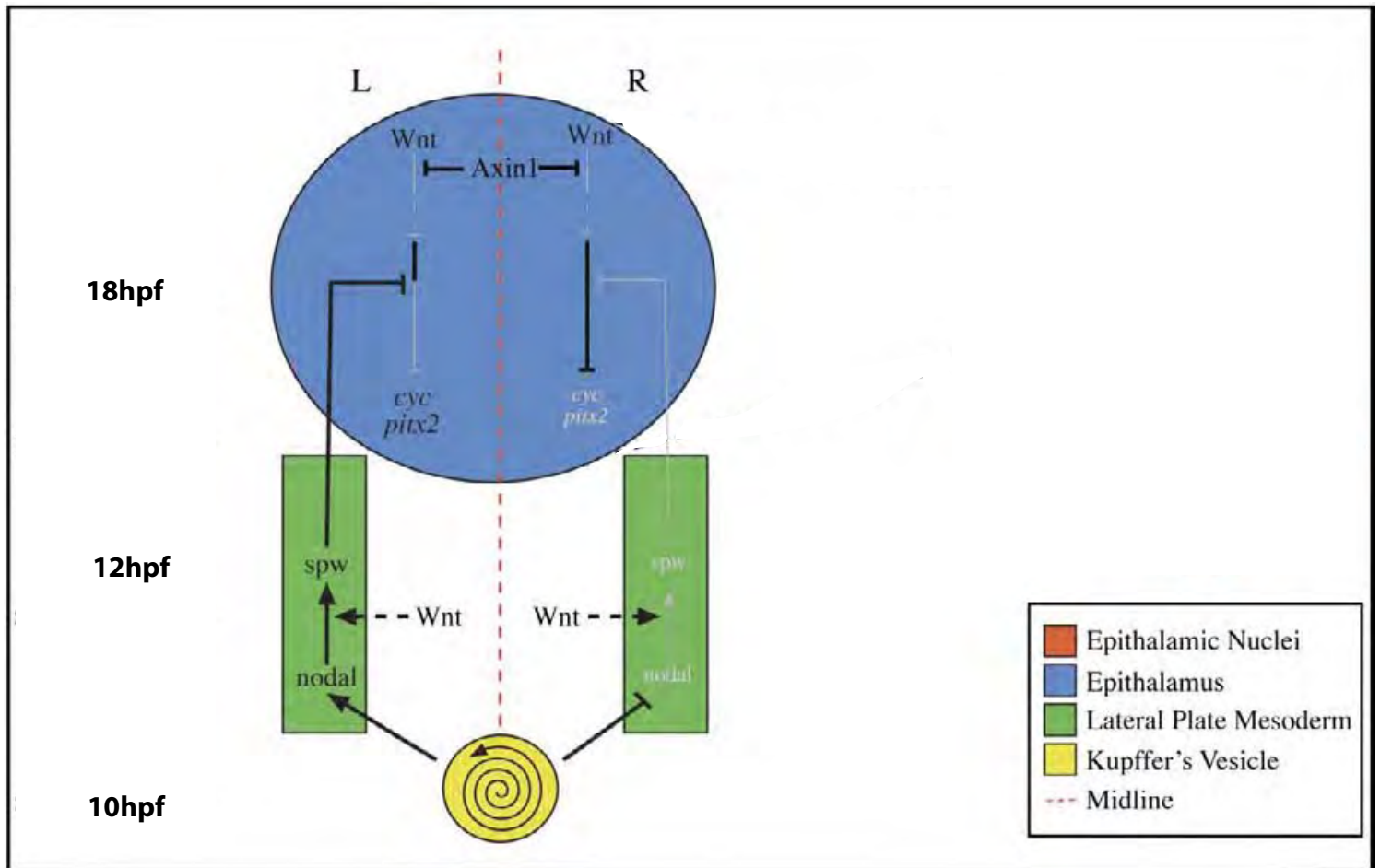


Figure 25 : La voie Wnt impose une repression de l'expression de *cyclops* dans l'épithalamus. Suite au flux dans la vésicule de Kupffer à 10hpf, *spw* est activé dans le mésoderme latéral gauche à partir de 12hpf. Dans l'épithalamus, la voie Wnt impose une répression de l'expression de *cyclops* dans l'épithalamus à 18hpf. En parallèle, cette repression est levée par l'activité de *spw* dans le mésoderme latéral gauche. Ceci conduit à l'expression unilatérale de *cyc* et *pitx2c* dans l'épithalamus à 18 somites (D'après Carl et al., 2007).

II.3. Taille et migration de la glande parapinéale

Chez *Danio rerio*, la glande parapinéale est située à gauche chez 95% des individus. Les précurseurs de la glande parapinéale sont situés en antérieur du territoire qui donne naissance à la fois à l'épiphyse et à la glande parapinéale. Cette dernière migre tout d'abord vers la gauche entre 28 et 36hpf puis postérieurement entre 36 et 48 puis revient ensuite vers la ligne médiane, sans jamais la franchir, pour atteindre sa position finale sous l'épiphyse.

La migration ainsi que le biais de la latéralité de cette petite structure en rosette sont gouvernés par deux voies de signalisation : la voie Fgf et la voie Nodal. La mise en place de cette structure requiert deux mécanismes : d'une part la migration et d'autre part le biais de la latéralité de la migration.

II.3.1. Rôle de la voie Fgf et du facteur de transcription *tbx2b*

Dans l'épithalamus, les composants de la voie de signalisation Fgf sont exprimés dès 24hpf. Le ligand *fgf8a* est exprimé dans la partie antérieure du complexe pinéal. A 30hpf, son expression persiste dans la glande parapinéale qui commence à se détacher de l'épiphyse. Fgf17 est également exprimé dans la pinéale mais son expression décroît rapidement et elle n'est pratiquement plus détectable par hybridation *in situ* à partir de 30hpf. Un récepteur aux ligands Fgf est présent dans la région de l'épithalamus. *fgfr4* est détecté dans le complexe pinéal entre 24 et 36hpf. La voie de signalisation est clairement active dans le complexe pinéal comme l'atteste l'expression de *erm*, un gène cible de la voie Fgf, dont la transcription est activée dans l'épithalamus et plus particulièrement dans le tiers antérieur du complexe pinéal à partir de 24hpf (Clanton et al., 2011; Regan et al., 2009).

Récemment, il a été montré que la perte de fonction totale de la voie Fgf dans le mutant nul *fgf8a^{x15}* entraîne une forte diminution du nombre de cellules formant la glande parapinéale. Le nombre de cellules de la parapinéale définies par l'expression des marqueurs spécifiques *gfi1.2* ou *sox1a* passe de neuf dans les individus sauvages à trois dans les individus mutants. L'addition dans le milieu de fortes doses (12μM) de SU5402, drogue qui inhibe spécifiquement la voie Fgf, phénocopie la diminution observée dans le mutant. Le mutant *frombeyond* (*fby*) pour le facteur de transcription *tbx2b* montre le même phénotype de nombre réduit de cellules (Snelson et al., 2008b) bien que cette perte n'affecte pas l'activité

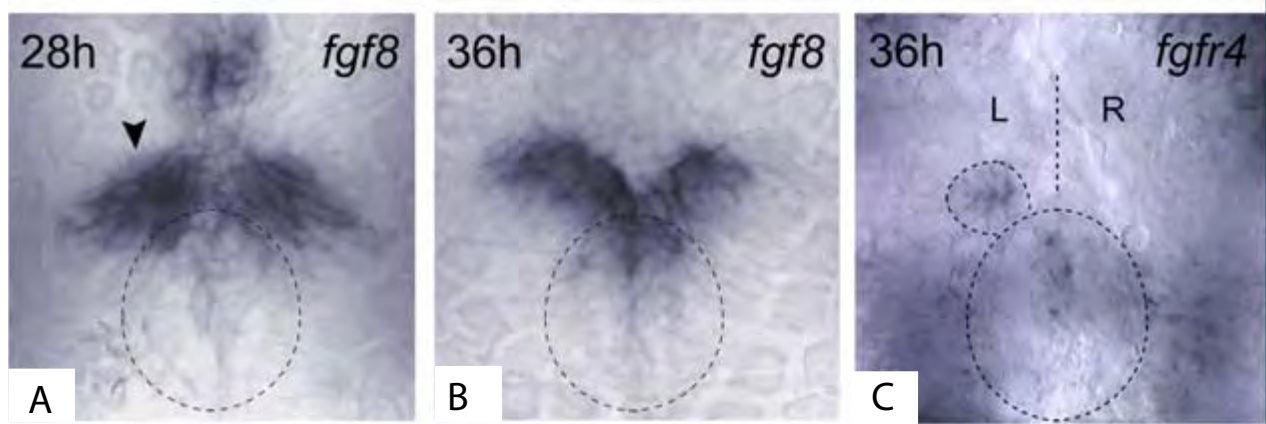


Figure 26 : Rôle de Fgf dans la mise en place de l'asymétrie de l'épithalamus.

A) Expression de *fgf8* à 28hpf. B) Expression de *fgf8* à 36h. On remarque une expression plus forte à gauche. C) *fgfr4* est exprimé dans la parapinéale en migration à 36h.

D) Dans un embryon sauvage, la parapinéale migre et sa latéralité est biaisée vers la gauche. E) En cas de perte de Nodal, la migration de la parapinéale se fait aléatoirement à gauche ou à droite. F) En cas de perte de fonction de *fgf8* dans le mutant hypomorphe *ace*, la parapinéale ne migre pas.

(D'après Regan et al., 2009)

de la voie Fgf. La double perte de fonction *fgf* et *tbx2b* n'accentuant pas le phénotype, il semble que *fgf8* et *tbx2b* agissent via deux voies différentes et aient des rôles redondants dans le maintien de la taille de la glande parapinéale. La voie Fgf ne contrôle pas le nombre de cellules par une régulation de la prolifération ou de l'apoptose mais elle gouverne le destin des progéniteurs du complexe pinéal : alors que dans la perte de Fgf le nombre de cellules de la parapinéale diminue, parallèlement, le nombre de photorécepteurs marqués par *arrestin3a* augmente dans la glande pinéale. Des expériences de suivi du destin cellulaire grâce à de la fluorescéine « décaquée » permettent d'affirmer que les progéniteurs, qui en l'absence de Fgf ne deviennent pas des cellules de la parapinéale, adoptent le destin photorécepteur qui semble être le destin par défaut des progéniteurs du complexe pinéal. Cependant, un gain de fonction de *fgf8* n'est pas suffisant pour induire un plus grand nombre des cellules *gfi1.2* positives dans la glande parapinéale (Clanton et al., 2012). La voie de signalisation Fgf est donc nécessaire mais pas suffisante au contrôle de la taille de la glande parapinéale.

Par ailleurs, le facteur de transcription *tbx2b* contrôle également le nombre de cellules de la parapinéale. *tbx2b* est exprimé à partir du stade 8 somites dans la partie antérieure du territoire épithalamique puis par la suite son expression est restreinte au complexe pinéal seul. Alors que le facteur de transcription *flh* semble réguler seulement la spécification de la glande pinéale, le facteur *tbx2b* agit seulement sur la glande parapinéale. En effet, dans le mutant *flh*^{-/-}, la glande parapinéale est présente mais la glande pinéale absente. Inversement, dans le mutant *tbx2b*^{-/-} (*from beyond*), la glande pinéale est présente et le nombre de cellules de la glande parapinéale diminue fortement (Snelson et al., 2008a). Comme dans la perte de *fgf8*, dans la perte de *tbx2b*, on pourrait supposer un changement du destin progéniteur parapinéal vers un destin pinéal. Cependant, dans le mutant *from beyond*, on n'observe pas d'augmentation du nombre de photorécepteurs de la glande pinéale marqués par l'expression *arrestin3a* (Clanton et al., 2012). Cependant, en l'absence de comptage du nombre total de cellules du complexe pinéal, on peut supposer qu'en l'absence de *tbx2b*, soit le nombre d'autres types cellulaires pinéaux pourrait être augmenté soit que la prolifération du pool initial de progéniteur est altérée.

La perte de fonction dans le mutant nul pour *fgf8* entraîne non seulement une forte diminution du nombre de cellules mais empêche également la migration des quelques cellules qui sont néanmoins spécifiées. Dans le mutant hypomorphe *ace*^{*tl282*} (*acerebellar*^{*tl282*}) ou lors du traitement avec des doses faibles de SU5402 (6µM), un nombre sauvage de cellules se spécifie mais la glande parapinéale ne migre pas. En cas de gain de fonction par implantation

d'une bille de *fgf* dans un mutant *ace*, la migration est restaurée. C'est entre 24 et 28hpf que la voie Fgf est nécessaire à la migration de la parapinéale (Regan et al., 2009). Fgf est donc nécessaire à la migration de la parapinéale mais il n'est pas suffisant pour biaiser la direction de la migration (Figure 26).

II.3.2. Rôle de la voie Nodal

En cas d'activité bilatérale de la voie Nodal, grâce à l'utilisation de morpholino *notail*, la migration de la glande parapinéale est randomisée (Concha et al., 2000). La perte de l'activité de Nodal par utilisation de SB431542, à une concentration de 100µM, engendre de la même façon une migration aléatoire vers la gauche ou la droite. L'asymétrie d'activité de la voie Nodal biaise la latéralité. Cependant, ce n'est pas la voie Nodal qui impose l'asymétrie car celle-ci, bien que randomisée, est présente même en cas d'absence de Nodal. Un lien entre d'une part la voie Fgf, nécessaire à la migration, et d'autre part la voie Nodal, nécessaire à la latéralité, expliquerait la migration biaisée vers la gauche de la glande parapinéale.

A 28hpf, l'expression du ligand *fgf8* montre une légère asymétrie et son expression est renforcée à gauche juste avant le début de la migration. En absence de Nodal, cette subtile asymétrie semble abolie et *fgf8* est exprimée bilatéralement et symétriquement (Regan et al., 2009). La même symétrisation de l'expression du ligand *fgf8* est observée chez les mutants *oep*. La voie Nodal n'est donc pas requise pour l'expression du ligand *fgf8* mais elle semble capable d'asymétriser son expression. En absence de signalisation de la voie Nodal, une source exogène de *fgf8* est suffisante pour biaiser la migration en direction de cette source. L'asymétrie de l'activité de la voie Fgf pourrait donc expliquer le biais dans la latéralité de la migration de la glande parapinéale.

Les facteurs exprimés dans le territoire habénulaire peuvent agir sur la migration de la parapinéale tant sur l'initiation de la migration que sur sa latéralité. Cependant, la glande parapinéale agit en retour sur les noyaux habénulaires notamment dans l'acquisition des marqueurs habénulaires.

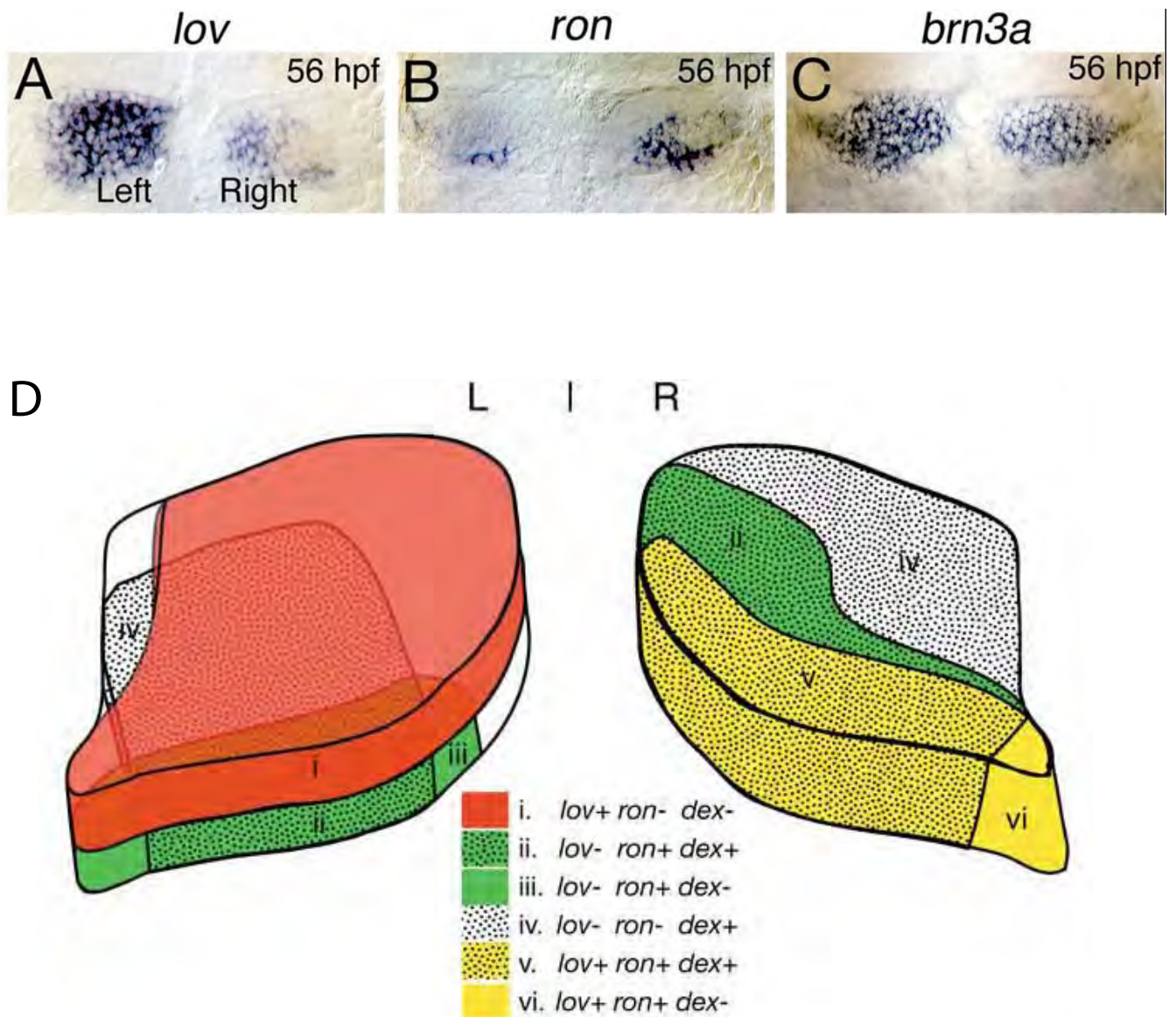


Figure 27 : Asymétrie de répartition des marqueurs des habenulae.
A-C) Hybridation *in situ* de *leftover/kctd12.1* (*lov*), *Right on /kctd12.2* (*ron*) et *brain3a* (*brn3a*) à 56hpf.
D) Schéma récapitulatif de la répartition des marqueurs au sein des habenulae. Certains domaines sont caractérisés par l'expression d'une combinaison de marqueurs.
(Aizawa et al., 2007 et Gamse et al., 2005)

II.4. Identité & asymétries habénulaires

Outre l'asymétrie neuro-anatomique flagrante de la position de la parapinéale, d'autres asymétries sont présentes au sein de l'épithalamus. Chez *Danio rerio*, différents marqueurs moléculaires sont exprimés dans l'habenulae dorsale : *brain3a* (*brn3a*) est un marqueur pan-neural exprimé dans toutes les cellules des deux noyaux habénulaires. D'autres marqueurs sont exprimés asymétriquement et vont définir des sous-domaines au sein des noyaux habénulaires : *kctd12.1/lov* est un domaine de tétramérisation du canal potassium (K⁺ Channel Tetramerisation Domain) dont l'expression est prédominante dans le noyau habénulaire gauche (Gamse et al., 2003). A l'inverse, *kctd8/dex* (*dexter*) et *kctd12.2/ron* (*righton*) sont principalement exprimés dans le noyau droit (Figure 27) (Gamse et al., 2005).

Les neurones des habenulae sont divisés en différentes populations en fonction de la combinaison de marqueurs qu'ils expriment (Gamse et al., 2005). L'acquisition de l'identité des neurones se fait à partir de 36hpf après la migration de la parapinéale. A 72hpf, des sous-domaines plus ou moins chevauchant sont stéréotypiquement définis par l'expression des marqueurs habénulaires. L'expression de ces marqueurs se fait sous l'influence de la glande parapinéale et des voies de signalisation Notch/Delta.

II.4.1. Influence de la parapinéale sur l'acquisition des identités

La corrélation entre position de la parapinéale et identité gauche de l'habenulae est forte. Lors de la perturbation de l'activité de la voie de signalisation Nodal qui randomise la migration de la parapinéale, l'expression de *leftover* est elle aussi randomisée : *lov* est exprimé de façon prédominante dans 50% des cas à gauche et dans 50% à droite (Figure 28 B et B'') (Gamse et al., 2003). L'expression plus étendue de *lov* dans l'habenulae gauche est toujours corrélée avec la position de la parapinéale à gauche de la ligne médiane.

Le mutant *flh* où le nombre de cellules pinéales est fortement réduit mais où la parapinéale est intacte, ne montre pas de défaut d'asymétrie des habenulae. Ceci suggère que la glande pinéale ne joue pas de rôle dans l'acquisition de l'identité des habenulae mais que

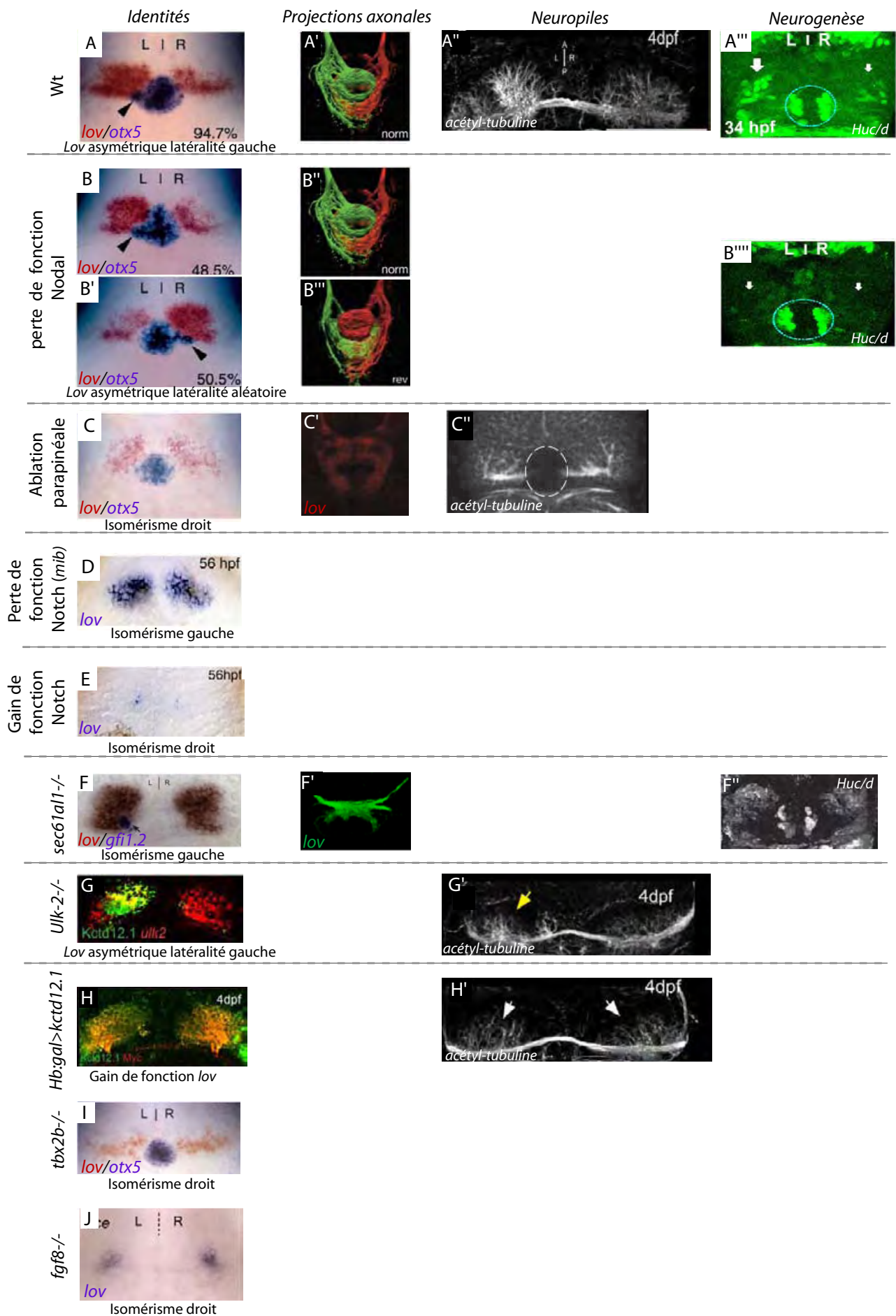


Figure 28 : Récapitulatif de la répartition de *kctd12.1/lov*, de l'organisation des projections axonales sur le noyau interpedonculaire, de la densité des neuropiles et de l'asymétrie de la neurogenèse en fonction des différentes conditions de gain ou de perte de fonction réalisées dans l'épithalamus du poisson zèbre. (d'après Gamse et al., 2003, Aizawa et al., 2003 et 2007, Doll et al., 2011, Taylor et al., 2011, Roussigné et al., 2009, Snelson et al., 2008, regan et al., 2009).

c'est la glande parapinéale pourrait influencer sur l'asymétrie moléculaire de l'habenulae (Gamse et al., 2003).

Des expériences d'ablation de la parapinéale ont permis de mettre en évidence l'action de la parapinéale sur l'identité des noyaux de l'habenulae. L'ablation au laser des progéniteurs de la glande parapinéale avant sa migration entraîne l'acquisition d'un isomérisme droit vis-à-vis des marqueurs *lov*, *ron* et *dex* : alors que l'expression de *lov* est fortement diminuée dans le noyau gauche (Figure 28 C), les domaines d'expression de *ron* et *dex* s'étendent. D'autres marqueurs de l'asymétrie des noyaux habénulaires sont affectés : alors que l'habenulae gauche sauvage est caractérisée par un réseau dendritique plus dense qu'à droite, dans les embryons dont la parapinéale a été éliminée, le réseau est symétrique avec un caractère droit. L'ablation de la parapinéale induit donc un isomérisme droit au niveau des marqueurs moléculaires et de la connectivité des habenulae (Gamse et al., 2003).

Parallèlement, le mutant *tbx2b*, qui montre un nombre réduit de cellules de la parapinéale, présente un isomérisme droit des identités habénulaires (Figure 28 I). Par ailleurs dans ce mutant, la glande parapinéale n'adopte pas sa forme spécifique de rosette et les cellules restent dispersées au sein de la glande pinéale. Le nombre de cellules de la parapinéale doit donc atteindre un seuil pour induire l'acquisition correcte des identités. Cependant, comme la position des cellules parapinéale est incorrecte, on ne peut pas exclure une influence de la migration de la parapinéale sur l'acquisition des identités des neurones (Snelson et al., 2008b).

Bien que l'existence d'un signal envoyé par la glande parapinéale vers les habenulae soit avérée, la nature de ce signal reste à ce jour inconnue.

II.4.2. Neurogenèse des habenulae

Au niveau des habenulae, l'asymétrie des marqueurs est associée à une asymétrie de la neurogenèse. A 28hpf, des progéniteurs marqués par l'expression de *cxc4b* sont présents dans l'habenula gauche. Plus tard, ce groupe se différencie en neurones matures et un groupe d'une dizaine de cellules HuC+, marqueur des neurones, apparaît à 34hpf dans le noyau gauche de l'habenulae (Figure 28A''' et B'''). Des neurones apparaissent ensuite dans l'habenulae droite dans un délai court d'environ une heure. Par la suite, les deux habenulae se développent parallèlement et la différence du nombre de neurones entre habenulae gauche et

droite n'est pas gommée bien qu'elle soit noyée dans le nombre croissant de neurones dans les deux noyaux habénulaires.

La glande parapinéale joue un rôle dans la mise en place de l'asymétrie d'identité des neurones entre noyaux gauche et droit de l'*habenulae*. Un signal envoyé par la glande parapinéale vers le territoire de l'*habenulae* gauche pourrait également être à l'origine de l'asymétrie de neurogenèse. Alors que dans les embryons sauvages un plus grand nombre de neurones HuC+ sont présents dans l'*habenulae* gauche à 34hpf, lorsque les cellules de la glande parapinéale sont détruites grâce à une ablation au laser, l'asymétrie du nombre de neurone persiste. Donc, contrairement à son rôle sur l'expression des marqueurs habénulaires, la glande parapinéale n'a aucun rôle dans l'établissement de l'asymétrie de neurogenèse.

La voie de signalisation Nodal est une candidate de choix parmi les facteurs pouvant imposer l'asymétrie de neurogenèse. L'activité bilatérale de Nodal dans les morphants *ntl* entraîne une symétrisation des groupes gauche et droit de neurones habénulaires. Il en va de même dans la perte de fonction précoce de la voie Nodal au niveau du mésoderme latéral des morphants *spw* qui entraîne une inhibition de l'expression de Nodal dans l'épithalamus. La perte de Nodal par incubation des embryons à partir de 10hpf dans une drogue inhibitrice de la voie, le SB431542, entraîne également une symétrisation de la neurogenèse. Il semble donc que la perturbation de la voie Nodal entraîne des défauts de l'asymétrie de neurogenèse.

Cette inhibition précoce ne permet pas de déterminer si c'est l'activité de la voie dans le mésoderme latéral ou dans l'épithalamus qui est nécessaire à la mise en place de l'asymétrie de l'épithalamus. Pour résoudre ce dilemme, les embryons ont été incubés dans le SB431542 à partir de 16hpf, juste avant l'initiation de l'expression de *cyc* dans le territoire présomptif de l'épithalamus gauche. Grâce à cette inhibition tardive, l'expression de *spw* dans le mésoderme n'est pas affectée. Malgré cela, les neurones des *habenulae* gauches et droites apparaissent en même temps. L'asymétrie de l'activité de la voie de Nodal dans l'épithalamus est nécessaire et suffisante pour créer l'asymétrie de neurogenèse (Roussigne et al., 2009).

Dans le cas de la perte ou du gain de fonction de Nodal qui rendent l'activité de la voie absente ou bilatérale, la neurogenèse est symétrique. Cependant, la fenêtre d'apparition des neurones étant étroite, les approches expérimentales ne permettent pas de savoir si la neurogenèse est avancée dans l'*habenulae* droite ou retardée dans l'*habenulae* gauche pour aboutir finalement à une symétrisation.

II.4.3 Acquisition de l'identité neurale et rôle de la Voie Notch/Delta

Le « timing » de la neurogenèse semble corrélé à l'identité finale des neurones de l'habenulae (Aizawa et al., 2007). Des expériences d'incorporation de BrdU ont permis de montrer que les cellules qui constituent la partie latérale des habenulae dorsales naissent plus tôt que celles qui constituent la partie médiale. En effet, entre 24 et 36hpf, les neurones apparaissent en plus grande quantité à gauche, où la partie latérale marquée par *lov* est plus importante. Par la suite, entre 48 et 72hpf, c'est à droite que l'activité neurogénétique est plus importante. Il semble cependant que le taux de prolifération, déterminé grâce à la détection de l'histone 3H phosphorylée, ne diffère pas entre noyaux gauche et droit. La photo-conversion de neurones habénulaires dans la lignée *Tg(flh :kaede)^{rw0130a}* a mis en évidence que les neurones photo-convertis à 36hpf, se localisent dorso-latéralement à 96hpf. Les neurones photo-convertis plus tard sont plutôt localisés médialement. Ces observations indiquent que la neurogenèse se fait séquentiellement du sous-domaine latéral vers le sous-domaine médial. L'analyse du destin d'un seul neurone photo-converti a montré que les neurones latéraux et médiaux sont issus d'un pool commun de progéniteurs.

Pour forcer le système neurogénique à produire les neurones de type *lov+* plus tôt ou plus tard, Aizawa et al. ont agi sur la voie Notch : l'activation ectopique de la voie Notch grâce à la surexpression de Notch Intra entre 28 et 32hpf a pour effet de réduire drastiquement le nombre de neurones *lov+* (Figure 28 E). Les habenulae adoptent un isomérisme droit lorsque la surexpression est réalisée à 48hpf, quand la production de neurones *lov+* est normalement à son minima, l'expression de *lov* dans les embryons gain de fonction reste de type sauvage. Dans les mutants *mindbomb (mib)*, l'activation de la voie Notch est perdue et la production de neurones est accrue (Figure 28 D). Dans ce cas, le nombre de neurones *lov* est grandement augmenté et on observe un isomérisme gauche. Il semblerait que le « timing » de la neurogenèse influe donc sur l'identité des neurones habénulaires (Aizawa et al., 2007).

Cependant dans les cas de perte ou de gain de fonction de la voie Notch, le nombre total de neurones semble globalement affecté. On ne peut pas exclure que la voie Notch, en plus de son action sur le « timing » de la production de neurones, influe également directement sur la production globale des neurones ou sur l'identité des neurones par un mécanisme d'inhibition latérale par exemple. Par ailleurs, le mutant *mib* montre un nombre accru du nombre de cellules pinéales et parapinéales ((Cau et al., 2008), Roussigné, résultats non publiés). Dans ce contexte, et dans la mesure où la glande parapinéale est directement

impliquée dans l'asymétrie habénulaire, on ne peut exclure que le nombre accru de cellules de la glande parapinéale influe sur l'acquisition des identités des neurones habénulaires.

II.4.3. Rôle du réticulum endoplasmique

Dans le gain de fonction pour Notch, les habenulae semblent adopter un isomérisme gauche alors que dans la perte de fonction, l'isomérisme est plutôt droit. Pour identifier d'autres acteurs impliqués dans le développement de l'asymétrie des habenulae, un crible génétique recherchant des altérations du profil d'expression de *lov* a été réalisé. Une mutation présente dans le gène *sec61a11* induit aussi un isomérisme gauche apparent quant à l'expression de *Lov* (Figure 28 F). Parallèlement, une diminution de l'apoptose dans les habenulae contribue à l'augmentation du nombre de neurones. L'isomérisme détecté pourrait donc être dû au fait que le nombre de neurones augmente drastiquement. Malgré l'altération de l'asymétrie des habenulae, le complexe pinéal reste intact et la glande parapinéale migre encore vers la gauche. Cela indique que l'axe gauche-droite reste intact. De plus, l'asymétrie dans le « timing » de la neurogenèse est conservée. Le gène *sec61a11* code pour une sous-unité de la machinerie de translocation du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique et est exprimé ubiquitairement dans l'embryon. Dans les embryons mutants, les filaments de F-actin normalement présents autour des jonctions adhérentes au pôle apical de la cellule sont désorganisés. Il en est de même pour d'autres marqueurs apicaux tels que l'aPKC (atypical Protein Kinase C). Doll et al. proposent que cette désorganisation cellulaire pourrait être la cause de la production excessive de neurones par augmentation du nombre de cellules basales dans l'épithélium à l'origine des neurones de l'habenulae (Doll et al., 2011).

II.4.4. Influence de signaux environnementaux

Le rythme circadien de la lumière entraîne la production de mélatonine, hormone produite la nuit et qui est détruite durant le jour ; cette hormone impose un rythme circadien physiologique et permet de stimuler la prolifération cellulaire (Danilova et al., 2004). Il existe

donc un lien entre l'exposition à la lumière, la mélatonine et l'expression de gène impliqué dans la balance prolifération/différenciation. L'organe siège de la production de la mélatonine chez le poisson zèbre est la glande pinéale où est synthétisé ANAAT, enzyme nécessaire à la biosynthèse de la mélatonine (Cau et sapède 2013, in press).

Pour examiner le rôle possible de la mélatonine sur le « timing » de neurogenèse et l'acquisition de l'identité des neurones dans les habenulae, des embryons ont été traités selon différentes conditions d'exposition à la lumière. Les marqueurs habénulaires ont été ensuite analysés. Les embryons élevés dans le noir constant depuis leur ponte présentent un délai dans l'expression de *lov*, *ron* et *cadps* (*calcium dependant activator protein for secretion 2*, marqueur exprimé bilatéralement et symétriquement dans les habenulae). Par exemple, le début de l'expression de *lov* est retardé de 38hpf à 48hpf. Le manque d'exposition à la lumière affecte spécifiquement la différenciation neuronale dans l'épithalamus car ni l'acquisition d'un nombre correct de neurones habénulaires, ni le développement du complexe pinéal ne sont affectés. De plus, l'expression de *lov* et *ron* dans d'autres régions du cerveau n'est pas perturbée, indiquant que les défauts d'acquisition de ces marqueurs sont spécifiques aux noyaux habénulaires. Le maintien dans le noir provoque un délai dans le pic de la mélatonine : normalement présent à 43hpf chez les embryons sauvages, la même concentration de mélatonine n'est atteinte qu'à 55hpf chez les embryons privés de lumière. L'ajout de mélatonine dans le milieu de culture des embryons permet de rétablir un développement normal des habenulae.

Comme un lien entre « timing » de neurogenèse et acquisition des marqueurs d'identité a déjà été établi, quel serait le rôle de la mélatonine dans ce système ? Dans les embryons où le pic de mélatonine est décalé, la neurogenèse des habenulae est également retardée. Les cellules restent à l'état progéniteur plus longtemps comme l'atteste l'accumulation de cellules *cxc4b*⁺ dans les habenulae. *Cxc4b* a été décrit comme un marqueur des progéniteurs des neurones habénulaires qui en se différenciant vont exprimer le marqueur pan-neural *HuC*⁺. Alors que le nombre de cellules progénitrices augmente, le nombre de neurones différenciés diminue. L'exposition à la lumière et la subséquente production de mélatonine régulent donc le « timing » de la neurogenèse (de Borsetti et al., 2011).

II.5. Connectivité & asymétrie des projections axonales

II.5.1. Asymétrie des projections axonales

Les asymétries retrouvées dans les habenulae trouvent écho dans les projections habenulo-interpédunculaires. Les neurones de l'habenulae dorsale gauche projettent sur la partie dorsale du noyau interpédunculaire alors que les neurones droits envoient leurs axones vers la partie ventrale (Aizawa et al., 2005). Cette généralité supporte quelques exceptions : même si la plupart des neurones situés dans l'habenulae gauche projettent en dorsal, quelques-uns innervent tout de même la partie ventrale de l'IPN. Il en est de même pour les neurones du noyau droit de l'habenulae (Figure 22, 28-A et 29). L'électroporation de plasmides conduisant à l'expression d'une GFP membranaire dans une cellule habénulaire unique permet de suivre les projections axonales : cette technique a permis de mettre en évidence que les axones se projettent ipsilatéralement jusqu'à l'IPN puis ils croisent plusieurs fois la ligne médiane en formant une spirale autour d'un tronc médial de cellules. Les spirales formées par les axones ne s'enroulent pas dans un sens stéréotypé et les axones provenant du même noyau de l'habenulae s'enroulent dans des sens inversés.

Ces analyses de la morphologie des axones ont montré une différence entre les axones gauches et droits ; les arborescences typiques des neurones gauches sont étroitement enroulées autour du cœur du noyau interpédunculaire. Elles possèdent un grand nombre de branchements dendritiques qui sont orientés vers le pôle dorsal et le centre de la couronne formée par les axones. La morphologie typique des neurones de l'habenulae droite est différente : les axones sont plus longs et leur enroulement est plus lâche. De plus, on observe moins de branchements dendritiques (Figure 29-II) (Bianco et al., 2008).

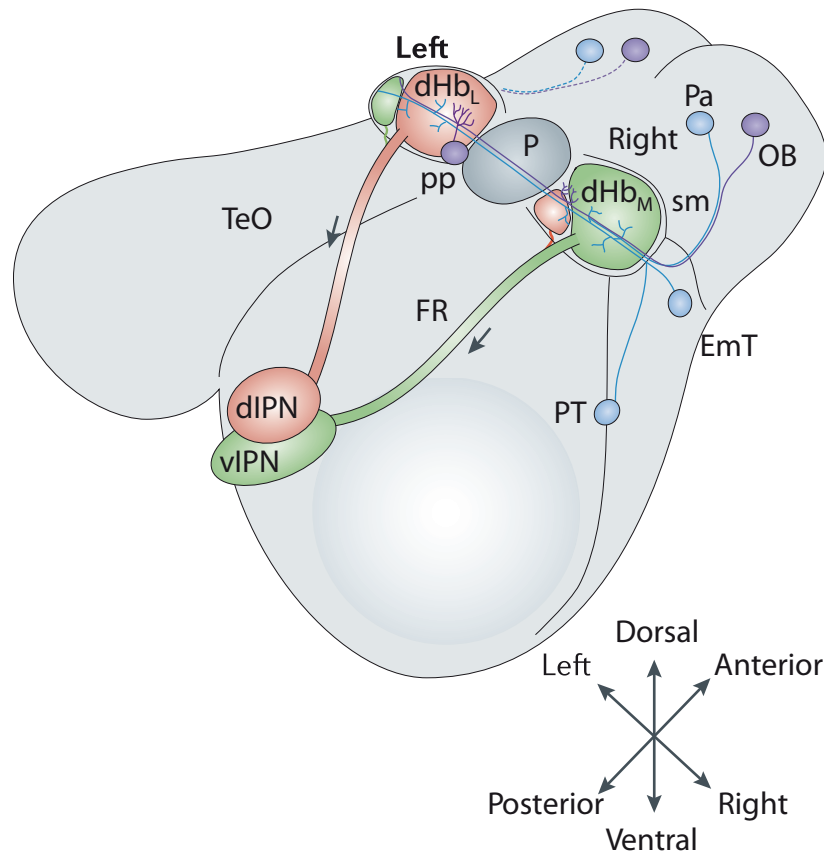
La parapinéale influe sur l'identité des neurones de l'habenulae et par conséquent sur leurs projections axonales (Figure 28 C'). Dans les embryons où une ablation de la parapinéale a été pratiquée, on observe une forte diminution de l'innervation de la partie

dorsale de l'IPN par les neurones habénulaires gauches. Au contraire, l'innervation de la partie ventrale par les neurones gauches est plus dense. Cette observation peut être corrélée au fait que, lors de l'ablation de la parapinéale, les noyaux des habenulae présentent un isomérisme droit. Il ne semble pas que les axones projetant en dorsal de l'IPN soient redirigés vers une cible ventrale mais, que lors de l'ablation de la parapinéale, seuls subsistent les neurones *lov+* projetant ventralement (Gamse et al., 2005). L'innervation du noyau interpédonculaire est donc corrélée à l'identité des neurones des noyaux des habenulae. En effet, le marquage des neurones *lov+* ou *ron+* par des anticorps spécifiques révèle que ce sont essentiellement les neurones *lov+* qui innervent la partie dorsale et les neurones *ron+* qui projettent sur la partie ventrale.

Dans les conditions de symétrisation de l'activité de la voie Nodal, 50% des individus ont une latéralité inversée au niveau des marqueurs des sous-domaines habénulaires. En conséquence, l'innervation de l'IPN est simplement inversée : l'habenula droite projette majoritairement en dorsal et l'habenula gauche plutôt en ventral de l'IPN (Figure 28 B'' et B''') (Aizawa et al., 2005). Sous-domaines habénulaires et cible des projections axonales sont donc très étroitement liés. Lors de l'ablation de la parapinéale, malgré l'isomérisme apparent des connexions, une subtile asymétrie persiste dans la densité, la latéralité et la forme des axones. Comme l'asymétrie de neurogenèse n'est pas affecté par l'ablation de la parapinéale, cette subtile asymétrie pourrait être liée à la persistance de l'asymétrie de neurogenèse. L'analyse globale des projections axonales dans l'absence de l'activité Nodal qui conduit à la symétrisation de la neurogenèse habénulaire n'a pas permis d'établir un tel lien.

Les neurones habénulaires se projettent donc de façon très stéréotypée sur l'IPN. Par quel système les neurones habénulaires parviennent-ils à atteindre précisément leur cible ? Le système des molécules sécrétées *semaphorin* se liant aux récepteurs *neuropilin* est connu dans la guidance axonale (Yoshida, 2012). Les neuropilines exprimées dans le cône de croissance des axones interprètent comme signaux attractifs ou répulsifs les sémaphorines exprimées par les tissus. Cette interprétation conduit les axones jusqu'à leur cible où ils établissent des connexions. *neuropilin1* (*nrpa1*) est exprimé dans les habenulae de façon asymétrique : l'expression est plus forte dans le noyau gauche. De façon intéressante, la perte de fonction de *nrpa1*, par injection de morpholino, perturbe l'innervation de la partie dorsale du noyau interpédonculaire : bien que le profil d'expression de *lov* ne soit pas changé, l'innervation de la partie dorsale de l'IPN est diminuée. La perte de fonction de sémaphorine phénocopie la perte de *nrpa1*. La surexpression de la sémaphorine *sema3D* par injection d'ARNm, quant à

I



II

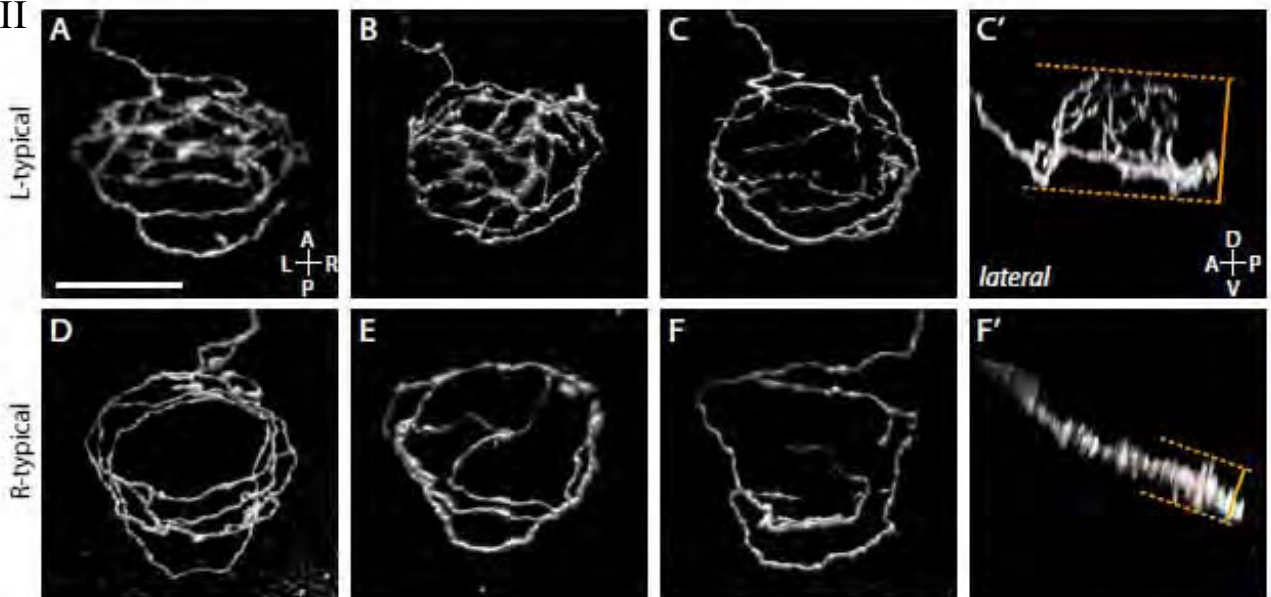


Figure 29 : Projections afférentes et efférentes des habenulae.

I) Schéma récapitulatif des connexions des habenulae. Pa = pallium; OB = bulbe olfactif; sm = stria medularis; EmT = éminence thalamique; PT = tuberculum posterieur; TeO = tectum optique; dIPN = noyau interpédonculaire dorsal; vIPN = noyau interpédonculaire ventral; P = glande pinéale; PP = glande parapinéale; dHbL = habenula dorso-latérale; dHbM = habenula dorso-médiale. (Concha et al., 2012).

II) Morphologie typique des projections axonales des neurones gauches visualisée grâce à l'électroporation focale (A-C'). Les projections s'enroulent étroitement en spirale et possèdent de nombreux branchements terminaux. Morphologie typique des projections axonales des neurones de l'habenula droite (D-F'). L'enroulement des axones sur eux-mêmes est plus lâche et les boutons terminaux sont moins densément ramifiés. (Vues dorsales A-C et D-F ; vues latérales C' et F'). (Bianco et al., 2008)

elle, induit des projections axonales ectopiques : au lieu de s'arrêter au niveau de leur cible initiale, les axones se projettent en postérieur du noyau interpédonculaire (Kuan et al., 2007). Il semble que les sémaphorines soient partie intégrante du système de guidage axonal des projections habénulaires.

II.5.2. Neuropiles habénulaires

Les neuropiles sont constitués d'un enchevêtrement de protrusions cytoplasmiques des neurones qui se logent entre les cellules. Le réseau de neuropiles dans l'habenulae a la particularité d'être asymétrique : ce réseau, révélé par la tubuline acétylée, est beaucoup plus dense dans l'habenulae gauche (Figure 28 A''). Le gène *ulk-2* (*unc-51-like2*) qui promeut la production d'extensions dendritiques, est exprimé dans les habenulae à partir de 48hpf. L'inhibition d'*ulk-2* empêche la formation de neuropiles et le réseau est bien moins dense à gauche comme à droite (Figure 28 G et G'). La surexpression de *lov* chez le poisson zèbre inhibe également la formation de neuropiles (Figure 28 H et H'). Inversement, dans le mutant *kctd12.1^{vu442}*, la production de neuropiles est augmentée. Le mutant *kctd12.2*^{-/-}, mutant nul pour *ron*, phénocopie la perte *lov*. Lov et Ron précédemment utilisés uniquement comme marqueurs apparaissent ici comme des acteurs actifs de l'élaboration de la structure habénulaire. Ulk-2 a été décrit comme interacteur de *lov* in vitro. Chez le poisson zèbre, *ulk-2* et Lov colocalisent dans les habenulae. Lov et Ulk semble donc interagir en vue de promouvoir la formation d'extensions cytoplasmiques : le fait que *lov* soit exprimé plus largement à gauche peut alors expliquer pourquoi le réseau de neuropiles est plus dense dans ce noyau habénulaire (Taylor et al., 2011).

II.5.3. Connexions afférentes

Les habenulae reçoivent des connexions afférentes provenant de nombreuses sources. Chez les mammifères ce réseau de connexions est bien décrit. Chez le rat, les habenulae latérales reçoivent des projections axonales émanant de noyau entopédonculaire qui est l'équivalent du *globus pallidus* des primates. Les régions limbiques du cerveau antérieur sont également connectées aux habenulae latérales chez les mammifères : des cellules se trouvant

II.6.1. Fonctions des habenulae

Chez le poisson zèbre, l'habenulae est impliquée dans les comportements adoptés en réaction à des situations de peur et d'anxiété. La menace d'un prédateur peut déclencher des comportements caractéristiques : grâce aux cellules ciliées de la ligne latérale, la larve perçoit la présence d'un prédateur en mouvement dans l'eau. La larve répond à cette perception par un mouvement de fuite caractéristique appelé courbure « C ». Outre la perception mécanique de la ligne latérale, le système olfactif est utilisé pour détecter de potentielles menaces. L'ajout de Schreckstoff (substance libérée par la peau de poissons blessés composée de chondroïtine, (Mathuru et al., 2012)) dans le milieu conduit à une accélération de la vitesse de nage. L'apprentissage par conditionnement suite à un choc électrique permet d'évaluer le réflexe de fuite et donc la réponse à la peur. Les larves de poisson zèbre sauvage peuvent apprendre à associer l'allumage d'une diode rouge à l'application d'un choc électrique. Cet apprentissage leur permet d'éviter le choc électrique en fuyant l'endroit où celui-ci est appliqué. Chez des larves où les noyaux habénulaires ont été endommagés par l'expression de la protéine Killer red KR11 (KR11 induit le relargage de dérivés actifs de l'oxygène suite à un photo-bleaching) ou de la toxine tétanique (qui prévient la transmission du signal neural), ce réflexe de fuite conditionné est diminué : au lieu de fuir, la larve reste immobile, ne cherchant pas à éviter le choc électrique (Lee et al., 2010). Cette absence d'évitement intervient après plusieurs expositions au stimulus de conditionnement. En l'absence d'habenulae pleinement fonctionnelles, les individus ne semblent pas pouvoir se rappeler qu'ils peuvent éviter le choc électrique. Le fait d'endommager les habenulae ne semble pas affecter d'autres aspects du comportement tels que l'exploration du milieu et n'altère pas l'activité locomotrice (Agetsuma et al., 2010). Les habenulae sont donc nécessaires à la modification des comportements liés à la peur et à l'anxiété et ce de façon dépendante à l'expérience et à la mémoire.

Chez les mammifères, le complexe habénulaire est une structure associée à l'apprentissage et la mémoire. Des lésions des noyaux habénulaires diminuent les performances cognitives du rat dans le labyrinthe de Morris. Dans ce labyrinthe immergé, le rat est plongé dans une piscine dans laquelle il doit retrouver une plateforme cachée juste sous la surface de l'eau. Les rats dont les habenulae sont lésées mettent plus de temps et nagent une plus grande distance avant de trouver la plateforme qui leur permet de sortir de l'eau (Lecourtier et al., 2004). Les récepteurs nicotiniques présents dans l'habenulae sont

particulièrement impliqués dans la mémoire spatiale : l'inhibition des récepteurs nicotiniques par injections de drogue inhibitrice dans les habenulae latérales augmente le nombre d'erreurs faites par les rats avant de trouver la plateforme dans la piscine de Morris (Sanders et al., 2009). Parallèlement, chez le singe rhésus, les neurones dopaminergiques sont liés à la temporalité de la mémoire : à la fois à la mémoire à court terme et à la mémoire à long terme (Bromberg-Martin et al., 2010). Hypothétiquement, mémoire et réponse au stress pourraient donc être liées via leurs connexions au complexe habénulaire.

Des anomalies dans le système sérotoninergique sont associées à l'anxiété et la dépression chez les humains. Il a été montré que la destruction de l'habenulae latérale chez les mammifères (équivalent de l'habenulae ventrale chez le poisson zèbre) améliore le comportement de rats souffrant de dépression en augmentant le niveau de sérotonine dans le raphé (Yang et al., 2008). Chez le *Danio rerio*, le peptide *kiss1* exprimé dans l'habenulae ventrale, semble moduler indirectement le système sérotoninergique dans le raphé. En effet, bien que les neurones *kiss1+* ne soient pas en connexion directe avec les neurones sérotoninergique du raphé, il existerait un relais avec des neurones non sérotoninergiques présents dans le noyau interpédonculaire (Ogawa et al., 2012).

II.6.2. Comportement latéralisés

Le lien entre asymétries neurales et comportements latéralisés est ténu mais intrigant. Parmi les comportements latéralisés chez le poisson, l'utilisation préférentielle de l'œil droit pour mordre des proies potentielles ou pour explorer un environnement nouveau a déjà été mise en évidence. Ces comportements n'ont pas été associés directement à une asymétrie neurale (Miklosi and Andrew, 1999; Miklosi et al., 1997).

Les asymétries retrouvées dans l'épithalamus sont un modèle de choix pour tenter d'associer les préférences de comportement avec des asymétries et latéralisation neurales. En effet, l'altération de la latéralité et des études comportementales sont possibles chez le poisson zèbre. Pour essayer d'établir une corrélation entre ces deux aspects, l'analyse du mutant *frequent situs inversus (fsi)* s'avère instructif. Chez ce mutant, la fréquence des individus *situs inversus* est proche de 25%. Comme l'inversion de latéralité est totale, l'orientation de l'asymétrie du cerveau (déterminée par la latéralité de l'épithalamus) et des viscères concorde.

Les larves placées dans un aquarium portant des miroirs sur ses faces montrent une préférence d'utilisation de l'œil gauche dans les premières minutes. Par la suite, elles explorent leur environnement brièvement avec l'œil droit pour revenir ensuite à l'utilisation

de l'œil gauche. Chez les individus *situs inversus*, l'utilisation préférentielle des yeux est parfaitement inversée y compris lors du changement brutal de l'utilisation de l'œil gauche vers l'œil droit. Les individus mutants préfèrent utiliser l'œil gauche pour approcher de potentielles proies. Cependant, tous les comportements ne sont pas inversés : en effet, lorsque les larves, mutantes ou non, sont introduites dans un environnement nouveau elles tournent toutes vers la gauche (Barth et al., 2005). Il semble donc que le changement de latéralité neurale du poisson influe sur certains de ses comportements latéralisés. Ces comportements biaisés chez les individus latéralisés à gauche ou à droite persistent chez l'adulte : les poissons adultes latéralisés à droite restent par exemple plus longtemps et plus près du prédateur que les poissons latéralisés à gauche (Dadda et al., 2009). Du fait que la latéralité de l'individu change entièrement, il est difficile de relier le changement de comportement avec un changement de latéralité de l'épithalamus.

Chez d'autres espèces de téléostéens comme les cichlidés, la relation entre asymétrie des habenulae et latéralisation des comportements est plus directe. Les habenulae des cichlidés sont asymétriques en taille, la gauche étant plus volumineuse que la droite. Malgré ce biais répandu au sein de la population, un large panel de variations de la différence de volume existe. Aussi, les individus qui présentent des habenulae symétriques ou dont le volume est légèrement plus grand à droite, ont tendance à tourner vers la droite et à utiliser leur œil gauche (Gutierrez-Ibanez et al., 2011). Cette étude met en avant la relation entre asymétries des habenulae et comportements latéralisés.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Au niveau du système nerveux, de nombreuses asymétries existent et sont formées grâce à la régulation fine de processus tels que la prolifération, la différenciation ou la migration, tous essentiels au maintien de l'homéostasie du tissu neural.

La voie de signalisation TGF- β /Nodal est essentielle à la rupture de la symétrie gauche-droite mais également à la coordination de la mise en place des différentes asymétries présentes dans l'épithalamus du poisson zèbre : l'activité de cette voie dans le territoire gauche de l'épithalamus biaise la migration de la parapinéale vers la gauche. Au sein de l'équipe, il a également été montré que la voie de signalisation Nodal est capable de créer une asymétrie de la neurogenèse dans les habenulae.

La façon dont Nodal régule cette différenciation précoce en neurone mature reste néanmoins inconnue. Le projet dans lequel s'inscrit mon travail de thèse vise à révéler les gènes cibles de Nodal qui jouent un rôle dans la mise en place des différentes asymétries de l'épithalamus. *Pitx2*, facteur de transcription appartenant à la famille des gènes à homéodomains, connu pour être une cible directe de la voie Nodal, est un candidat de choix pour faire le lien entre la voie de signalisation Nodal, neurogenèse asymétrique et latéralité de l'épithalamus. De plus, de nombreuses études montrent le rôle essentiel de *pitx2c* dans la latéralité et l'asymétrie de structures viscérales comme le cœur ou les poumons. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'action de *pitx2c* sur la neurogenèse asymétrique des habenulae d'une part et sur l'établissement des asymétries moléculaires et de connectivités finales de l'épithalamus des habenulae d'autre part.

RESULTATS

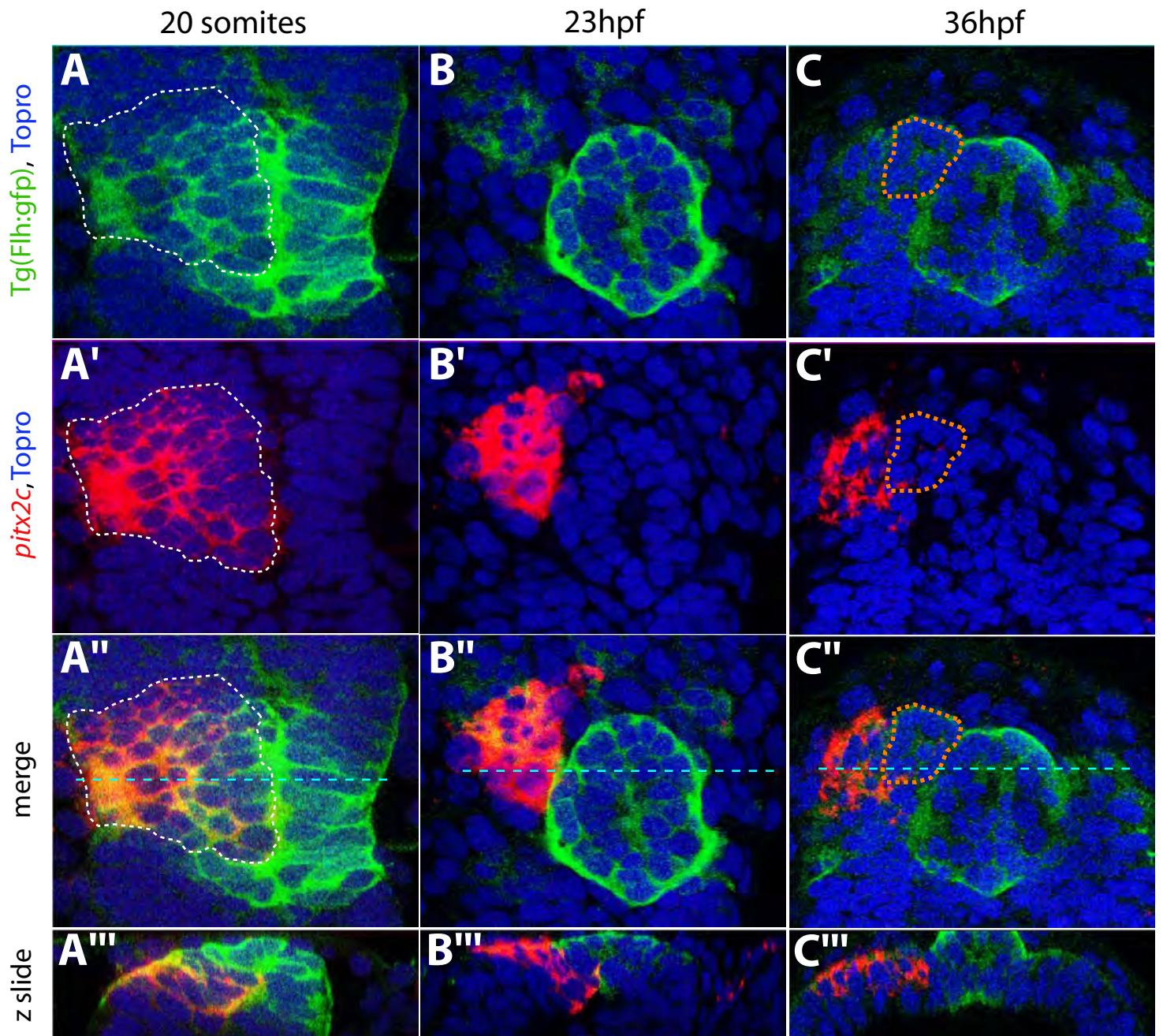


Figure 30 : Patron d'expression de *pitx2c* dans l'épithalamus du poisson zèbre.

A à A''') Vue dorsale du patron d'expression de *pitx2c* dans les embryons de stade 20 somites. A) La lignée *Tg(flh:kaede)* marque le territoire épithalamique précocement. A') *pitx2c* est exprimé dans la partie antérieure gauche de l'épithalamus. A'' - A) Une partie du domaine d'expression de *pitx2c* se superpose au domaine *flh*. A''') L'expression de *pitx2c* est plus ventrale comparée à celle de *flh* sur une vue frontale.

B à B''') Vue dorsale du patron d'expression de *pitx2c* dans les embryons de 23hpf. B) L'expression de la GFP dans la lignée *Tg(flh:GFP)* est restreinte au complexe pineal. B'') *pitx2c* est exprimé dans le territoire de l'habenulae gauche. B''-B''') *pitx2c* est exclu du complexe pinéal.

C à C''') Vue dorsale de l'épithalamus 36hpf. C') *flh* est toujours présent dans la glande pinéale mais est exclu de la glande parapinéale en migration (ligne pointillée orange). C'') *pitx2c* est exprimé dans l'habenula gauche et est exclu des cellules de la glande parapinéale. C''') L'expression de *pitx2c* et celle de *flh* sont mutuellement exclusives.

I) EXPRESSION DE PITX2C

Parmi les trois isoformes de *pitx2* présentes chez le poisson zèbre, seule l'isoforme *2c* est exprimée dans l'épithalamus. Son expression est restreinte au côté gauche du territoire présomptif de l'épithalamus en réponse à l'action de la voie de signalisation Nodal.

Précocement, au début de son expression au stade 20 somites, le domaine d'expression de *pitx2c*, visible par hybridation *in situ*, occupe toute la partie antérieure gauche du domaine marqué par *Tg(flh :Kaede)* (Figure 30A-A''). En vue frontale, on peut remarquer que *pitx2c* se situe dans la partie la plus ventrale du domaine de *flh* (Figure 30A'''). Rapidement, l'expression de *pitx2c* est exclue du domaine d'expression de *flh* et à 23hpf, les deux domaines sont mutuellement exclusifs (Figure 30 B-B'''). A 36hpf, *pitx2c* est exclu des cellules de la parapinéale en cours de migration (Figure 30C-C''').

L'expression de *pitx2c* est maintenue jusqu'à 72hpf où elle est présente dans l'habenulae gauche. L'initiation de l'expression de *pitx2c* est déclenchée par l'activité de la voie Nodal (Concha et al., 2000; Liang et al., 2000). En effet, si l'activité de Nodal est inhibée par traitement au SB431542 (Roussigne et al., 2009), l'expression de *pitx2c* est éteinte et ne réapparaît pas au cours du temps (Figure 31). Cependant, le maintien de l'expression jusqu'à trois jours de développement ne peut pas être assuré par cette voie de signalisation dont l'activité s'éteint à 20hpf. Le maintien de l'expression de *pitx2c* pourrait être assuré par une boucle de rétrocontrôle de *pitx2c* sur lui-même. Cependant, l'injection de morpholino contre *pitx2c* ne permet pas d'éteindre cette expression tardive. *Pitx2c* n'est donc pas requis pour maintenir son expression au sein du territoire épithalamique. Ces résultats suggéreraient l'action d'un autre facteur permettant le maintien de l'expression de *pitx2c* dans l'épithalamus. Le fait que l'expression de *pitx2c* ne soit pas altérée lorsque la voie de signalisation Nodal est bloquée plus tardivement (entre 22 et 30hpf) par ajout de drogue suggère que le maintien de *pitx2c* passe par une voie de signalisation qui n'appartient pas à la superfamille Nodal/. En effet, le SB431542 est un analogue de l'ATP qui se fixe sur tous les récepteurs TGF- β de type I (ALK4; ALK5 et ALK7, Nodal/Activine) qui bloque leurs activités catalytiques (Inman et al., 2002).

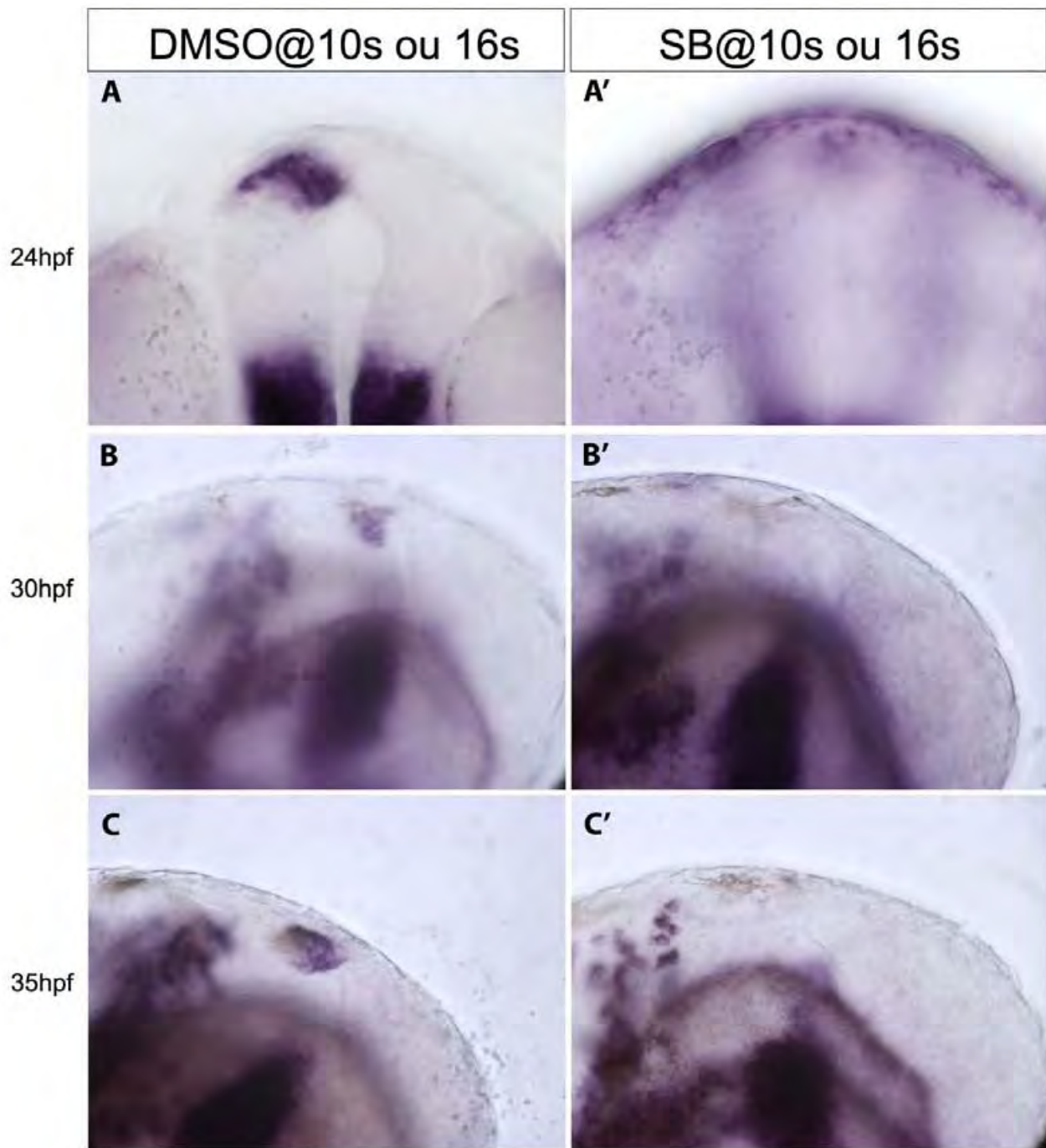


Figure 31 : L'expression de *pitx2c* est initiée par l'activité de la voie de signalisation Nodal.

Lorsque la voie de signalisation Nodal est bloquée par ajout de SB431542 (100μM) à 10 ou 16 somites, l'expression de *pitx2c* n'est pas initiée (A-A'). Alors que dans les individus sauvages, l'expression de *pitx2c* persiste après 30hpf (B-C), dans les individus traités avec l'inhibiteur de la voie Nodal, l'expression de *pitx2c* n'est pas rétablie (B'-C').

II) IMPLICATION DE *PITX2C* DANS LA NEUROGENESE ASYMETRIQUE DES HABENULAE

La voie de signalisation Nodal impose l'asymétrie de neurogenèse dans les habenulae (Roussigne et al., 2009). La façon dont cette voie de signalisation crée cette asymétrie était jusqu'à aujourd'hui inconnue et l'étude des différents gènes cibles de la voie sur la neurogenèse a permis de combler cette étape manquante. La liste des gènes cibles connus de la voie et exprimés dans l'épithalamus est seulement composée de deux gènes : *lefty-1* et *pitx2c*. *lefty-1* est connu pour être un inhibiteur de la voie Nodal et crée une boucle de rétrocontrôle négatif qui permet d'inhiber l'activité de cette voie de signalisation. De plus, son expression est très transitoire : *lefty* n'est exprimé dans l'épithalamus qu'entre 20 et 22hpf. Ces données ne laissent pas présager d'action de *lefty* sur la neurogenèse. *Pitx2c*, quant à lui, est exprimé plus longtemps et son implication dans la mise en place d'autres asymétries font de lui un candidat de choix dans la mise en place de l'asymétrie de la neurogenèse. Des approches expérimentales par gain et perte de fonction ont permis d'établir si *pitx2c* fait le lien entre activité de la voie Nodal et neurogenèse asymétrique.

II.1. *Pitx2c* est nécessaire à la neurogenèse asymétrique des habenulae

Pour explorer le rôle de *pitx2c* dans la neurogenèse des habenulae, des approches par perte et gain de fonction ont été réalisées. Pour inhiber l'action de *pitx2c*, deux morpholino ont été créés : le premier cible la région où se trouve le codon ATG pour bloquer l'initiation de la traduction (Mo1 *Pitx2c*). Le second cible la région en amont du site ATG (Mo2 *Pitx2c*). Afin de contrôler la spécificité de l'action des morpholino contre *pitx2c*, un morpholino contrôle a été synthétisé : il comporte des mésappariements dans la séquence du Mo1 *Pitx2c*.

Dans le but de quantifier l'action de *pitx2c* sur l'asymétrie de neurogenèse, le nombre de neurones GFP+ a été compté dans les habenulae gauche et droite dans la lignée *Tg(HuC :GFP)* qui marque les neurones matures à 36hpf. Parallèlement, afin de quantifier le degré d'asymétrie, un index d'asymétrie ($AI = [\text{nombre de neurones à gauche} - \text{nombre de neurones à droite}] / \text{nombre total de neurones}$, (Roussigne et al., 2009)) a été calculé. Dans les embryons sauvages, un groupe de neurones HuC+ apparaît plus tôt dans l'habenulae gauche. A 36hpf, l'index d'asymétrie moyen de la cohorte d'embryons sauvages est élevé (Figure 32 A, D, D'). Dans les embryons injectés au stade une cellule avec un des deux morpholino

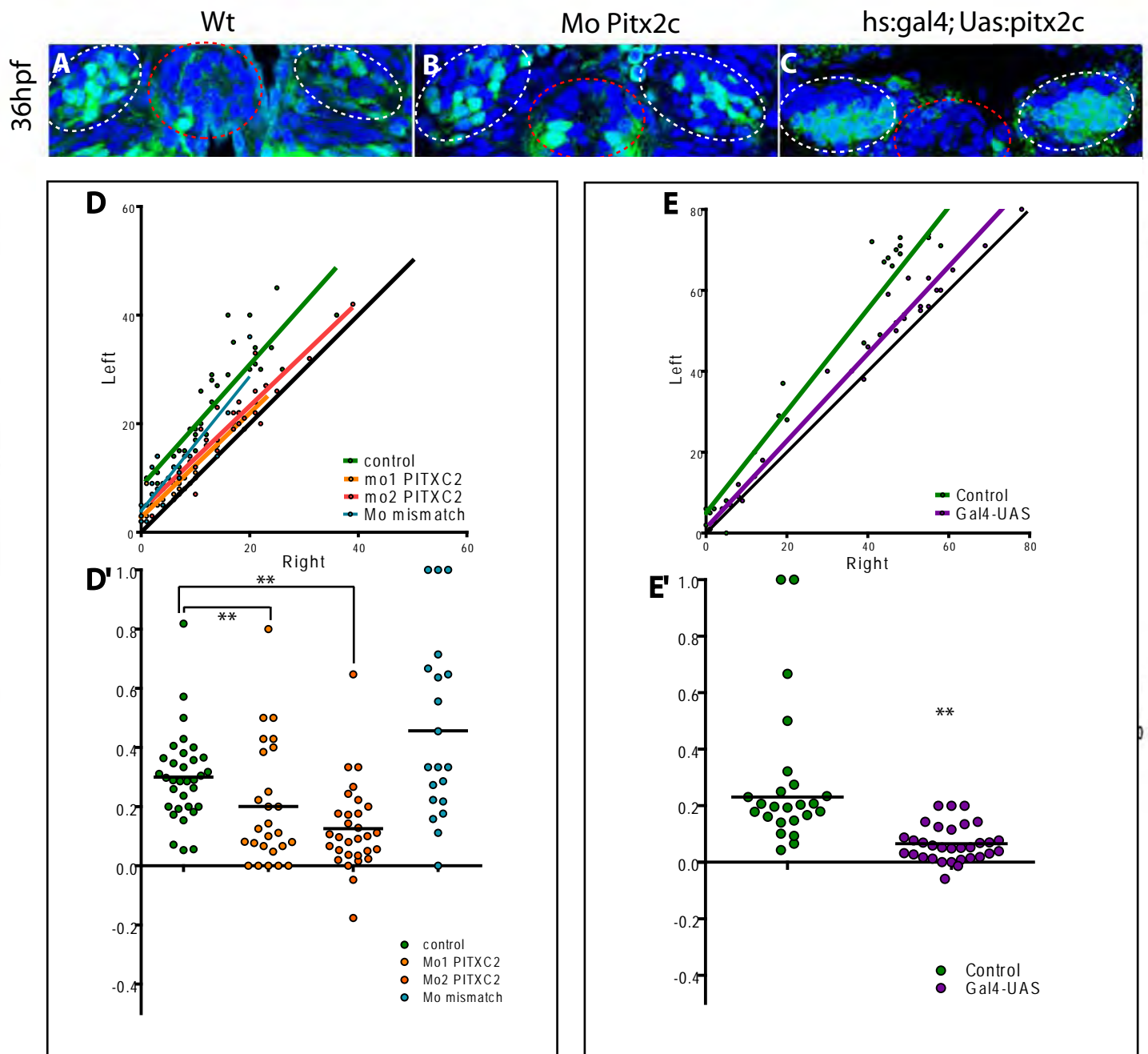


Figure 32 : *Pitx2c* impose l'asymétrie de neurogenèse des habenulae.

A-C) Vue dorsale d'embryons de 36hpf dans lesquels une immunodétection de Huc (en vert) a été réalisée. Ce marqueur permet d'observer les neurones matures présent dans les noyaux habénulaires dans différents contextes : dans des embryons sauvages (A), morphants *pitx2c* (B) et gain de fonction pour *pitx2c* (C). Les cercles pointillés blancs entourent les noyaux habénulaires. La ligne pointillée rouge encercle la glande pinéale.

D) Nombre brut de neurones dans les habenulae gauches et droites. La ligne noire matérialise la symétrie parfaite. Une droite de régression a été tracée pour chaque conditions contrôle ou perte de fonction.

D') Index d'asymétrie représenté pour chaque embryon contrôle ou perte de fonction *pitx2c*. La ligne noire représente la moyenne de chaque cohorte. L'index d'asymétrie des conditions morphantes sont significativement différents des conditions contrôles ($p^{**} < 0.01$)

E) Nombre brut de neurones dans les habenulae gauches et droites dans les embryons gain de fonction *Tg(hs:gal4;uas:pitx2c)* et contrôles *Tg(uas:pitx2c)*.

E') Index d'asymétrie représenté pour chaque embryon contrôle ou gain de fonction. Les deux cohortes sont significativement différentes en utilisant un t-test. ($p^{**} < 0.01$)

dirigés contre *pitx2c*, les neurones ont également été quantifiés. Dans ces embryons, la neurogenèse devient plus symétrique : l'index d'asymétrie est significativement différent de celui des embryons contrôle et sa valeur est proche de 0 qui représente la symétrie parfaite (Figure 32 B, D, D').

Parallèlement, une approche par gain de fonction a été réalisée grâce à la création d'une lignée transgénique *Tg(uas:pitx2c)*. Une fois croisée avec des individus *Tg(hs:gal4)*, un choc thermique d'une heure à 39°C a été réalisé sur les embryons âgés de 18 somites (18 hpf). Un choc thermique à ce stade, permet de forcer l'expression ubiquitaire et donc bilatérale de *pitx2c* dans l'épithalamus à partir de 20hpf, stade où *pitx2c* endogène est présent. L'expression ubiquitaire du mRNA *pitx2c* environ 3 heures après le choc thermique a été vérifiée par hybridation *in situ*. Les embryons contrôles, ayant subi le même choc thermique mais ne portant pas le transgène *uas:pitx2c*, conservent une asymétrie de la neurogenèse. En revanche, les embryons gain de fonction *Tg(hs:gal4);Tg(uas:pitx2c)*, génotypés par PCR, présentent le même nombre de neurones dans le noyau gauche et le noyau droit de l'habenulae (Figure 32 C, E, E'). Comme pour les morphants, l'AI est significativement différent de celui des embryons contrôle et sa valeur est plus proche de 0.

En conséquence, l'asymétrie d'expression du gène *pitx2c* est nécessaire à la mise en place de l'asymétrie de neurogenèse présente dans les habenulae.

II.2. Pitx2c agit de manière cellulaire autonome dans les neurones de l'habenulae.

L'asymétrie de neurogenèse nécessite donc l'action de *pitx2c*. Cependant, les expériences de gain et de perte de fonction de *pitx2c* ne permettent pas de savoir si *pitx2c* agit de manière cellulaire autonome sur les neurones de l'épithalamus gauche. En d'autres termes, *pitx2c* doit-il être exprimé dans les cellules progénitrices pour que celles-ci se différencient plus tôt en neurones ? La technique de transplantation de cellules fournit un modèle élégant pour répondre à cette question.

Dans ces expériences de greffe, les embryons donneurs sont injectés au stade une cellule avec le Mo1 Pitx2c et avec un colorant vital, la lysine rhodamine dextran, qui sert de marqueur indélébile des cellules transplantées. Des groupes de cellules issus des embryons ainsi marqués sont transplantées dans des embryons sauvages. Au stade dôme (4hpf), où se fait la transplantation, il est impossible de savoir quel est le territoire qui va donner les habenulae, du fait de l'absence de carte de territoire présomptif à ce stade. Aussi, le groupe de

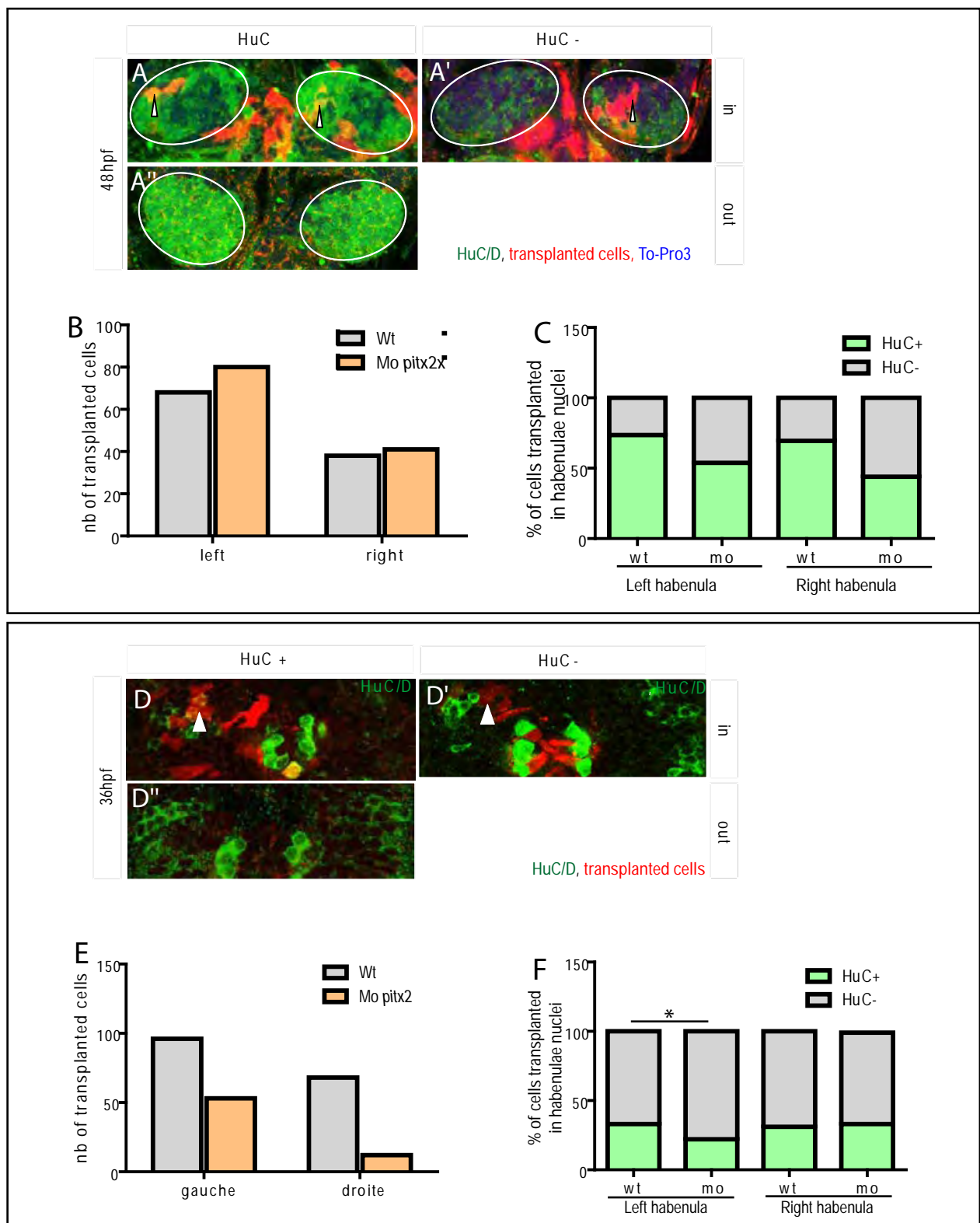


Figure 33 : Pitx2c agit sur la différenciation neuronale de manière cellulaire autonome.

A-A'') Répartition possible des cellules transplantées (en rouge) au sein des noyaux habénulaires marqués par HuC (en vert) à 48hpf.

B) Nombre de cellules transplantées dans des embryons hôtes sauvages (33 individus receveurs de cellules sauvages et 32 receveurs de cellules Mo1 *pitx2c*) et retrouvées localisées dans les habenulae. Cellules sauvages et morphantes *pitx2c* sont capables de s'intégrer dans les habenulae.

C) Pourcentage de cellules capables de se différencier en neurones (HuC+, en vert).

D-D'') Localisation à 36hpf des cellules transplantées.

E) Nombre total de cellules transplantées se situant aux abords ou au sein des habenulae à 36hpf (47 individus receveurs de cellules sauvages et 80 individus receveurs de cellules Mo1 *pitx2c*).

F) Pourcentage de cellules transplantées capables de se différencier en neurones (HuC+, en vert). La comparaison des pourcentages test χ^2 ($p^* < 0.05$) révèle une plus grande proportion de cellules HuC+ lorsque que les cellules transplantées sont sauvages.

cellules transplantées n'est pas inséré dans une région particulière. Après cette étape délicate de transplantation, le développement des embryons se poursuit jusqu'à 34 ou 48hpf, stades auxquels des neurones sont normalement détectés dans les habenulae. Par la suite, des immunomarquages sont effectués pour savoir si les cellules transplantées sont capables de devenir des neurones précoces. La transplantation de cellules sauvages est faite en parallèle et ainsi les fréquences avec lesquelles des cellules sauvages ou « morphantes *pitx2c* » deviennent des neurones précoces ont été comparées. Si l'activation de *pitx2c* est directement requise dans la cellule pour l'asymétrie de la neurogenèse dans l'épithalamus, nous attendons que les cellules morphantes *pitx2c* deviennent des neurones précoces en plus faible fréquence que les cellules sauvages. S'il n'y a pas de différence entre les fréquences des cellules sauvages et mutantes dans leur capacité à devenir les neurones qui apparaissent plus tôt dans le noyau gauche de l'habenula, alors nous pourrions conclure que l'effet de *pitx2c* sur l'asymétrie dans l'épithalamus n'est pas cellulaire autonome.

Tout d'abord, nous avons souhaité vérifier si les « cellules morphantes » étaient capables d'intégrer les habenulae et de se différencier en neurones matures exprimant le marqueur HuC+. Pour cela, les cellules ont été transplantées au stade dome et les embryons se sont ensuite développés jusqu'à 48hpf. A ce stade, les habenulae comptent de nombreux neurones différenciés dans les noyaux gauche et droit. Tout d'abord, il est à noter que les cellules sauvages et morphantes sont capables d'intégrer les habenulae (Figure 33B). Comme la transplantation se fait de manière aléatoire, on s'attendrait à avoir un nombre égal de cellules intégrées à gauche et à droite sachant que le nombre total de cellules dans chaque habenulae est environ égal à ce stade de développement. Cependant, de façon surprenante un plus grand nombre de cellules, morphantes ou sauvages, sont transplantées dans le noyau gauche de l'habenula. En excluant le biais de manipulation du fait que les cellules sont transplantées de façon aléatoire au sein de l'embryon receveur, aucune hypothèse ne peut expliquer cette observation.

Pour savoir si les cellules transplantées étaient capables de devenir des neurones matures, une immuno-détection de HuC a été réalisée à 48hpf. Deux cas de figures se posent : dans le premier, les cellules transplantées intègrent le noyau habénulaire mais ne sont pas HuC+ (Figure 33A-A'''). Dans le second, les cellules intègrent le noyau habénulaire et se différencient en neurones matures exprimant HuC. Globalement, les cellules transplantées sauvages ou morphantes sont capables de devenir des neurones. Cependant, on peut observer que les cellules morphantes *pitx2c* deviennent moins souvent des neurones HuC+ que les

cellules sauvages (figure 33C). *Pitx2c* influencerait donc la capacité des progéniteurs à se différencier en neurones HuC+.

Afin de savoir si *pitx2c* est nécessaire aux cellules gauches pour devenir les neurones précoces gauches, le développement des embryons a été arrêté à 36hpf. A ce stade, l'asymétrie de neurogenèse est visible. De la même manière que précédemment, nous avons tout d'abord vérifié si les cellules transplantées étaient présentes dans les habenulae à ce stade. Les cellules sauvages sont intégrées dans les deux noyaux habénulaires. Cependant, le déficit d'intégration des cellules transplantées dans l'habenulae droite est toujours notable (Figure 33E). Les cellules morphantes *pitx2c* sont retrouvées en nombre inférieur dans les habenulae en comparaison aux cellules sauvages. De plus, le même biais d'intégration gauche versus droite est également retrouvé : l'habenula droite intègre un nombre très faible de cellules morphantes malgré le grand nombre d'embryons transplantés (n=63). A ce stade, les habenulae ne sont pas clairement structurées : ni de façon anatomique car les cellules ne forment pas encore un noyau à proprement parler avec des limites nettes, ni grâce à des marqueurs qui définiraient l'ensemble des cellules progénitrices et différenciées formant les noyaux habénulaires plus tard. Cette incertitude quant à l'appartenance des cellules transplantée aux habenulae pourrait expliquer la différence de la fréquence d'intégration des cellules transplantées entre 36hpf et 48hpf. Les cellules morphantes pourraient rester dans un état progéniteur plus longtemps que les cellules sauvages. Dans l'incapacité de marquer toutes les cellules progénitrices, il est possible que les cellules transplantées dans les habenulae ne soient quantifiables fiablement que plus tard dans le développement.

Alors que les cellules sauvages transplantées font parties du groupe de neurones précoces gauches dans 33% des cas, elles n'intègrent ce groupe que dans 20% des cas lorsqu'elles sont perte de fonction pour *pitx2c* (Figure 33F). Cette différence est significative (test du χ^2 , $p=0.045$). Dans l'habenulae droite, où un faible nombre de neurones différenciés est présent à 36hpf, les proportions sont quasi-identiques entre cellules sauvages et morphantes (χ^2 , $p=0.647$). L'ensemble des résultats des expériences de transplantation suggèrent que *pitx2c* est nécessaire de façon cellulaire autonome dans les cellules habénulaires gauches pour que celles-ci deviennent les neurones précoces gauches.

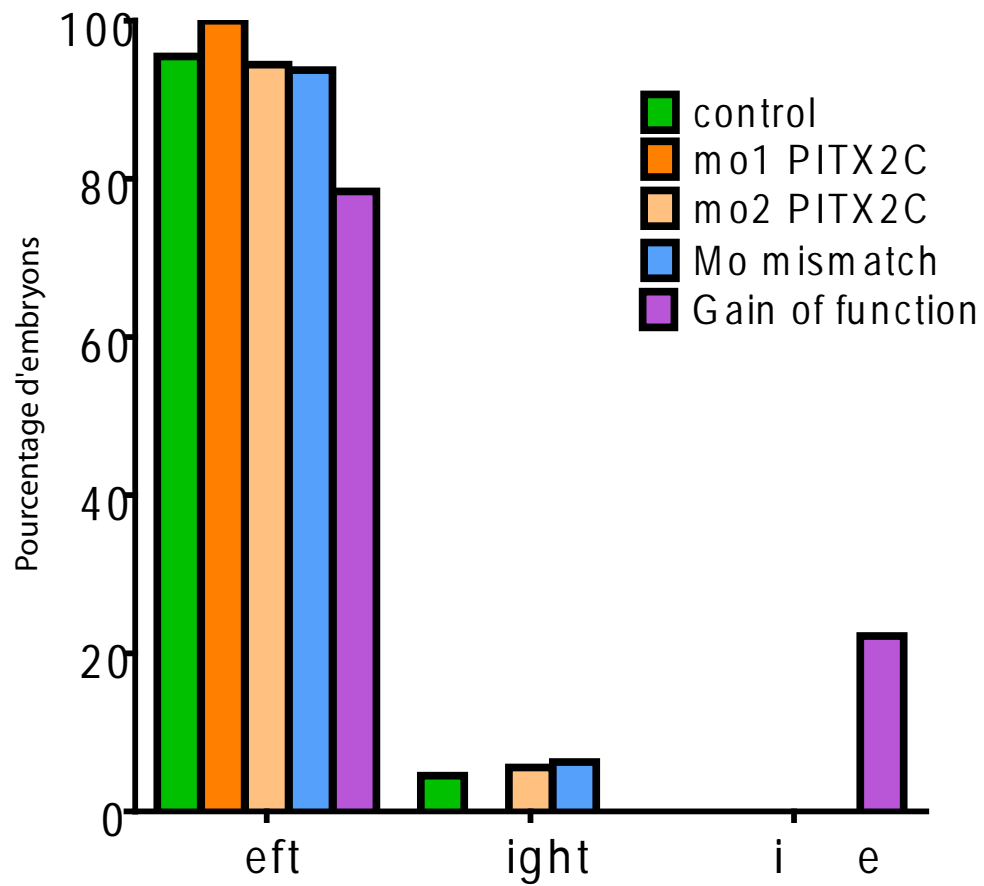


Figure 34 : *pitx2c* n'affecte pas la latéralité de la migration de la glande parapyinéale. Le graphe représente le pourcentage d'embryons présentant la glande parapyinéale à gauche, à droite ou non migrée. La latéralité de la migration est majoritairement gauche dans toutes les conditions.

II.3. Pitx2c n'influe pas sur la latéralité de la parapinéale

Il est connu que la perte d'activité de la voie Nodal dans l'épithalamus engendre une latéralité aléatoire de la glande parapinéale et entraîne la symétrisation de la neurogenèse des habenulae. Une hypothèse parcimonieuse pour lier ces phénotypes serait que sous l'influence de la voie Nodal, l'asymétrie de neurogenèse biaise la latéralité de la migration. Comme *pitx2c* impose également l'asymétrie de neurogenèse dans les habenulae, la perturbation de *pitx2c* devrait avoir une action sur la latéralité de la migration de la glande parapinéale. Contrairement à l'hypothèse, dans les contextes de perte ou gain de *pitx2c* qui symétrisent la neurogenèse, la parapinéale migre préférentiellement vers la gauche (Figure 34). Dans la condition perte de fonction, lorsque le heat-shock est réalisé à 16s, on peut observer malgré tout que dans environ 20% des cas, la parapinéale reste très proche de la ligne médiane. On peut cependant noter que malgré cette absence de migration complète, les cellules se trouvent plutôt à dans la moitié gauche du complexe pinéal. Il semble que Nodal contrôle les asymétries de l'épithalamus via plusieurs gènes cibles : *pitx2c* contrôlerait la neurogenèse et des cibles encore à déterminer contrôlèrent la latéralité de la migration de la parapinéale.

II.4. Action de *pitx2c* sur les projections axonales habenulo-interpédonculaire

Pitx2c est donc clairement impliqué dans la mise en place d'une asymétrie de neurogenèse. N'influençant pas la latéralité de la migration de la parapinéale, l'asymétrie de neurogenèse pourrait avoir une influence sur l'acquisition des identités habenulaires. Il a été montré que l'identité des neurones est conditionnée par le « timing » de différenciation : les neurones nés les premiers adoptent une identité *kctd12.1/lov+* (Aizawa et al., 2007). A 36hpf, les premiers neurones *lov+* sont détectés dans le noyau gauche de l'habenulae. Des hybridations *in situ* dans des embryons perte de fonction pour *pitx2c*, ont révélé une symétrie précoce de l'expression de *lov* (Figure 35 A-B). Du fait que l'asymétrie de neurogenèse apparaisse dans une fenêtre de temps très étroite, il est impossible de dire si l'expression de *lov* est symétrisée à cause d'un retard de la neurogenèse de l'habenulae gauche.

Cependant, l'identité des neurones et la cible ventro- ou dorso-interpédonculaire de leurs projections axonales sont associées ; les neurones *lov+* projettent en majorité sur la partie dorsale de l'IPN (Bianco et al., 2008; Gamse et al., 2005). En l'absence de la parapinéale suite à son ablation une asymétrie résiduelle persiste (Bianco et al., 2008), bien

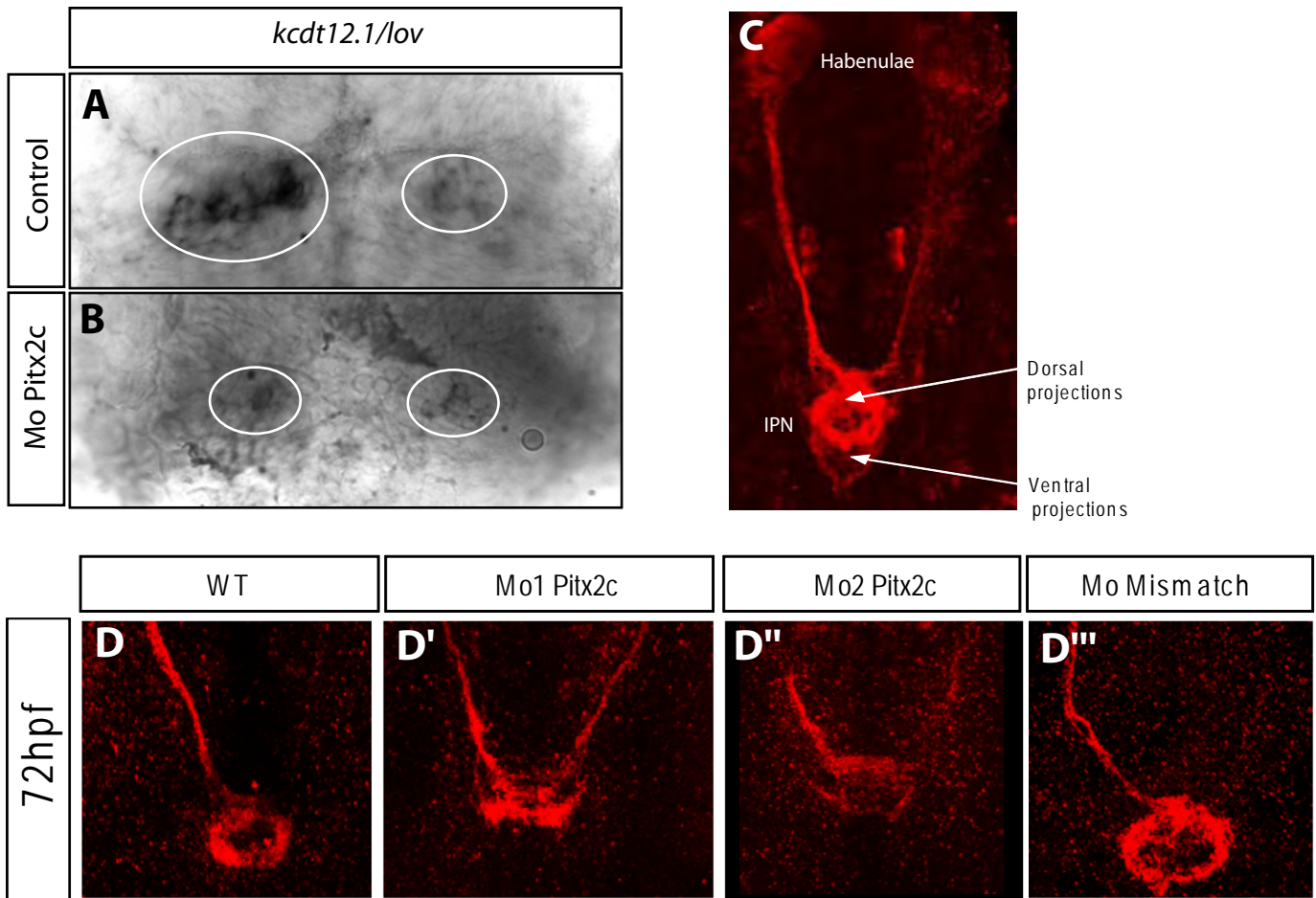


Figure 35 : Les projections axonales sont affectées dans la perte de *pitx2c*.

A-B) Le marquage par hybridation *in situ* *kcd12.1/lov* révèle la perte de l'asymétrie d'identité des premiers neurones à 36hpf.

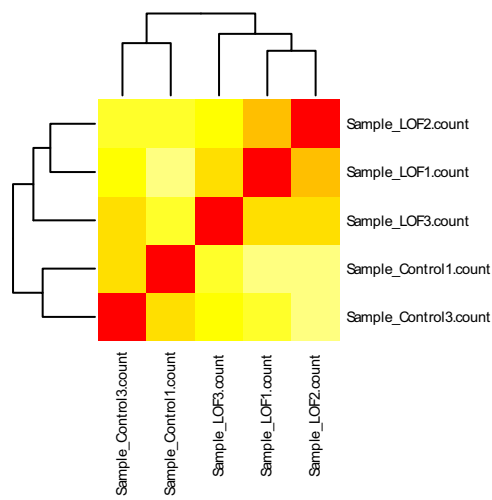
C-D-D''') Projections axonales visualisées par immunodétection avec l'anticorps *lov* dans des embryons sauvages (ou contrôles) à 3dpf. Une grande partie des projections *lov*⁺ ont pour cible la partie dorsale du noyau interpedonculaire (IPN).

D'-D'') La perte de *pitx2c* induit une désorganisation des projections axonales *lov*⁺ au niveau de l'IPN à 3dpf.

que les projections axonales atteignent en majorité la partie ventrale de l'IPN. Cette asymétrie pourrait être due à la persistance de l'asymétrie de neurogenèse des habenulae mise en place indépendamment de l'action de la parapinéale (Roussigne et al., 2009). Dans ce contexte, quelle conséquence la symétrisation de la neurogenèse a-t-elle sur les projections axonales vers le noyau interpédonculaire ? Afin d'observer les projections axonales, nous avons réalisé des immuno-détections grâce à l'anticorps *lov*. La protéine Lov étant répartie à la membrane de la cellule, nous avons pu suivre le cheminement des axones vers leur cible ainsi que la morphologie globale des projections au niveau du noyau interpédonculaire. A 3dpf, les projections sont parfaitement établies. Dans les individus contrôle (sauvages ou injectés avec le Mo contrôle), les axones partant de l'habenula gauche sont fasciculés en un tractus épais. A droite, la fibre nerveuse est beaucoup plus fine (figure 35 C). Au niveau du noyau interpédonculaire, en vue dorsale, on observe une couronne épaisse et dense d'axones dans la partie dorsale. Peu de cellules *lov+* projettent leurs axones sur la partie ventrale de l'IPN. L'enroulement des axones y est bien plus lâche et la forme globale rappelle celle d'un fer à cheval (Figure 35 C,D et D''). Dans les individus morphants *pitx2c*, la structure des projections est grandement désorganisée. Le phénotype le plus fort consiste en un arrêt prématuré des projections axonales sur la partie la plus antérieure de l'IPN (Figure 35 D'). Dans le reste des embryons morphants, les projections sont peu nombreuses et l'enroulement ne se fait pas correctement (Figure 35 D''). Le même type d'analyse à 4 dpf révèle le même phénotype montrant que la désorganisation apparente des projections n'est pas simplement due à un retard de projection des axones. La désorganisation globale des projections habenulo-interpédonculaire ne permet pas de conclure quant à la position dorsale ou ventrale des terminaisons axonales.

II.5. Gènes cibles de *pitx2c*

La façon dont *pitx2c* impose l'asymétrie de neurogenèse est inconnue. Il semble cependant y avoir deux processus distincts. Premièrement, il existe un programme qui permet de mettre en place la neurogenèse globale des habenulae. En effet, malgré l'absence de Nodal ou de *pitx2c*, des neurones sont produits et forment les habenulae. Un deuxième processus, dépendant de Nodal et de *pitx2c*, permet d'imposer une asymétrie de neurogenèse avec l'apparition de neurones plus précocement dans l'habenula gauche. L'asymétrie de



Ribonucleoprotein	cytoskeleton regulation	cell death regulation	Helicase activity	Regionalization	Calcium trafic	Nucleoside binding	Cell motility	Ion homeostasis
HNRNPD1, SNRPD3, HNRPKL, HNRNPH1 RPL3, HNRNPH1, MVP SF3B3	CFL2, CFL1, COTL1 SMYHC2, EZR, MYHB, SCINLA, PXN	CASP6, CASP3B, CASP8L1 BOKA, SPPL2, IDE, NRD1, CASP8L1, HNRNPH1	XRCC6, ATP1A1A.3, DDX39B, VASA, ATP1B1B, DDX3, TOP2A, ATP1B3B SMARCA2	CHD, MYHB, AHCYL1, SCINLA, PXN, CAPRIN2, GLI1	POC1BL, CRELD2, CALM3B, CACNA1BA, CAPNS1A, S100U, S100V2, RGN, CIB2, ANXA3B, S100A1	ATP1A1A.3, CAMK2D2, DDX3, DDX39B, GC3, HSP90B1, HSPA5, HSPA8L, IKBKE, MT2, MYHB, OLA1, PAPSS2A, PAPSS2A, RIOK3, RRAD, SARS2, SARS2, SMARCA2, SMYHC2, TOP2A TUBA4L, VARS2, VASA, SIRT5, HNRNPD1, CEL2F, HNRNPH1, IGF2BP1, PNPO,	SMYHC2, EZR, MYHB, VASA, LMNA, MT2, RPL3, HSPB1, TUBA4L, TOP2A, PXN	ATP1A1A.3, CA15A, SEPW1, RGN

Cell motion	Ion transport	Peptidase activity	Immunoglobulin	Nucleotide binding	Ion binding	Membrane protein	Transcription factor	Kinase	GTP binding
CHD, EZR, ATP1A1A.3, ROBO4, DSCAM, GLI1,	ATP1A1A.3, ATP1B1B, ATP1B3B CA15A, DDX3, DDX39B, SCN1LAB, TOP2A, VASA, XRCC6, CA15A, CACNA1BA, UROS, ASNS, GC3 SCN1LAB, SLC7A2,	CASP6, IMMP2L, SPPL2, CASP3B, IDE, NRD1, CASP8L1, ENTPD4, HNRNPH1 UBE2D2,	NADL1.1, ROBO4, FGFRL1B, CEACAM1, DSCAM F3A, REL,	HNRNPD1, CEL2F, IGF2BP1, HNRNPH1	ANXA3B, ATP1B1B, CA15A, CACNA1BA, CALM3B, CAPNS1A, CIB2, CRELD2, ENTPD4, GLI1, HAGH, IDE, LSS, MT2, NENF, NR2F1B, NR4A2A, NRD1, PHOSPHO1, PHYHD1, POC1BL, PRDM13, PRKCBP1L, PXN, RGN, S100A1, S100U, S100V2, SEPX1A, SIRT5, SMYD1A, SYTL3	ATP1A1A.3, ATP1B1B, ATP1B3B, CACNA1BA, CACNA1BA, CLDNH, CYB5R2, DSCAM F3A, FGFRL1B, IMMP2L, MS4A17A.9, NADL1.1, OCLNA, PAQR8, POC1BL, ROBO4, SCN1LAB, SLC18A2, SLC7A2, SORT1B, SPPL2, TLR3, TSPO, VAMP8, GC3,	CEL2F, CREB3L3L, IGF2BP1, IRF5, NKX2.9, NR2F1B, NR4A2A POU1F1, REL, SEPX1A, SF3B3 SIRT5, SMARCA2, TOP2A, XRCC6,	IKBKE, PRKCBP1L, RIOK3, CAMK2D2 MTMR6, GC3	OLA1, RRAD, TUBA4L

Figure 36 : Clusters fonctionnels des gènes dérégulés significativement dans la perte de fonction de *pitx2c*.
A) Cohérence des conditions perte de fonction *pitx2c* (LOF1 à 3) et contrôles (Control 1 et 3). Plus la couleur est proche du rouge, plus les listes de gènes concordent.
B) Clusters fonctionnels organisés grâce à DAVID-Gene ontology. Les noms de gènes surlignés en bleu apparaissent au moins deux fois entre les différentes banques de données qui permette d'organiser les gènes en clusters fonctionnels.

par la banque ZFIN, 19 gènes sont décrits comme exprimés dans le diencephale et donc putativement dans l'épithalamus.

Indépendamment du classement par clusters et par une analyse systématique de la liste de gènes, nous avons pu extraire une liste des gènes d'intérêt dont l'expression est fortement diminuée dans la perte de fonction *pitx2c*. Parmi ces derniers, on retrouve le gène *intraflagellar transport 80 (ift80)* ; $p = 2,93E-25$), décrit comme impliqué dans la fonction des cils et dans l'activité de la voie de signalisation Shh. On trouve également des gènes impliqués dans la signalisation Shh comme *gli1* ($p = 0,015939319$). D'autres gènes voient leur expression augmentée dans la perte de fonction de *pitx2c* : c'est le cas de *nkx2.9* qui est connu pour être une cible de la voie Shh. Par ailleurs, les gènes *gli1* et *nkx2.9* font partie du cluster qui regroupe les gènes exprimés dans le diencephale. Shh est connu pour être impliqué dans la production des neurones habénulaires : en effet, en l'absence de signalisation shh (par traitement avec l'inhibiteur spécifique cyclopamine), la production des neurones habénulaires est abolie (Halluin et al., en préparation). Shh est donc le signal qui induit la neurogenèse globale des habenulae. La modulation des composants de la voie Shh par *pitx2c* pourrait permettre une activité accrue de la voie Shh dans l'habenulae gauche conduisant à l'apparition précoce de neurones à gauche. Les composants de la voie Shh sont donc des candidats de choix pour expliquer la mécanistique moléculaire conduisant à l'asymétrie de neurogenèse dans les habenulae.

III) PITX2C AGIT SUR L'IDENTITE HABENULAIRE EN REGULANT LA TAILLE DE LA PARAPINEALE.

III.1. Résumé de l'article :

En parallèle de son action sur la neurogenèse, la perte de *pitx2c* a d'autres conséquences dans l'établissement des asymétries finales de l'épithalamus. En effet, dans les morphants *pitx2c*, l'expression du marqueur *kctd12.1* (*lov*) est symétrisée à 3dpf. Alors que *pitx2c* n'est exprimé que dans le territoire gauche de l'épithalamus, seule l'expression de *lov* dans l'habenulae droite est étendue, aboutissant à un isomérisme gauche. Il était déjà connu que la glande parapinéale influait sur l'identité des habenulae. Lors de l'ablation de la parapinéale, les habenulae adoptaient un isomérisme droit. Malgré le fait que *pitx2c* n'agisse pas sur la latéralité de la parapinéale, il contrôle néanmoins la taille de cette petite structure. En effet, la perte de *pitx2c* conduit à un nombre anormalement élevé de cellules parapinéales. Des analyses *in vivo* et en temps réel ont permis de mettre en évidence une augmentation de la prolifération des cellules de la parapinéale après leur spécification. Dans le but de savoir si l'isomérisme gauche observé dans les habenulae était dépendant du nombre de cellules de la parapinéale, nous avons réalisé des ablations de cellules de la glande parapinéale. L'ablation complète de la glande parapinéale dans le contexte morphant *pitx2c* induit un isomérisme droit montrant que la glande parapinéale est bien le relais entre *pitx2c* et l'isomérisme observé dans les habenulae. Nous avons ensuite voulu savoir si la réduction du nombre de cellules de la parapinéale dans les individus morphants permettait de restaurer un phénotype correct dans l'expression de *lov*. Des ablations partielles de la glande parapinéale, diminuant le nombre de cellule de parapinéale ont permis de restaurer l'asymétrie du marqueur *lov*. Ces expériences ont mis en évidence l'existence d'une limite supérieure du nombre de cellules au delà de laquelle l'identité des habenulae est affectée. Un point intrigant est que la perte de *pitx2c* ne récapitule pas le phénotype observé dans la perte du signal Nodal alors qu'il a été montré que *pitx2c* est une cible directe de la voie Nodal dans l'épithalamus. Dans la perte totale de l'activité de la voie Nodal dans l'épithalamus, la taille de la parapinéale et l'asymétrie des marqueurs habénulaires sont inchangés. La signalisation Nodal pourrait promouvoir l'augmentation de la taille de la glande parapinéale et *pitx2c* agirait pour réprimer cette

activité. En absence de Nodal, le contrôle de la prolifération par *pitx2c* ne serait donc plus nécessaire. Dans le but de mettre en évidence l'existence d'un équilibre entre les activités de Nodal et *pitx2c*, nous avons réalisé des expériences de diminution de l'activité de la voie Nodal par addition de concentration décroissante de SB431542, inhibiteur de la voie Nodal. Alors que de fortes doses qui abolissent complètement la voie Nodal ne changent pas la quantité de cellules dans la parapinéale, la diminution de l'activité par addition de plus faibles doses de SB431542 diminuent significativement le nombre de cellules de la parapinéale. La diminution de l'activité de la voie Nodal combinée à la perte de fonction de *pitx2c* restaure un nombre de cellules correct. Ces résultats mettent en évidence une balance entre l'activité de Nodal et l'action de *pitx2c* pour réguler la taille maximale de la glande parapinéale.

III.2. *pitx2c* ensures habenulae asymmetry by restricting parapineal size

Pitx2c ensures habenular asymmetry by restricting parapineal cell number

Laurence Garric^{1,2}, Brice Ronsin^{1,2}, Myriam Roussigné^{1,2}, Sabrina Booton³, Joshua T. Gamse³, Pascale Dufourcq^{1,2*} and Patrick Blader^{1,2*}

¹ Université de Toulouse, UPS, Centre de Biologie du Développement (CBD), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

² CNRS, CBD UMR 5547, F-31062 Toulouse, France

³ Department of Biological Sciences, Vanderbilt University, Nashville, TN 37205, USA

*Authors for correspondence: patrick.blader@univ-tlse3.fr, pascale.dufourcq@univ-tlse3.fr

tel: (0033) 5 61 55 67 34

fax: (0033) 5 61 55 65 07

Running title: Pitx2c restricts parapineal cell number

Summary

Left-right (L/R) asymmetries in the brain are thought to underlie lateralised cognitive functions. Understanding how neuroanatomical asymmetries are established has been achieved through the study of the zebrafish epithalamus. Morphological symmetry in the epithalamus is broken by leftward migration of the parapineal, which is required for the subsequent elaboration of left habenular identity; the habenular nuclei flank the midline and show L/R asymmetries in marker expression and connectivity. The Nodal target *pitx2c* is expressed in the left epithalamus, but nothing is known about its role during the establishment of asymmetry in the brain. We show that abrogating Pitx2c function leads to the right habenula adopting aspects of left character, and to an increase in parapineal cell numbers. Parapineal ablation in Pitx2c loss-of-function results in right habenular isomerism indicating that the parapineal is required for the left character detected in the right habenula in this context. Partial parapineal ablation in the absence of Pitx2c, however, reduces the number of parapineal cells to wild-type levels and restores habenular asymmetry. We provide evidence suggesting that antagonism between Nodal and Pitx2c activities sets an upper limit on parapineal cell numbers. We conclude that restricting parapineal cell number is crucial for the correct elaboration of epithalamic asymmetry.

Introduction

The epithalamus is composed of the left and right habenulae and the pineal complex, itself composed of the pineal gland and the parapineal nucleus (Concha and Wilson, 2001). While the habenulae link the anterior forebrain to the ventral midbrain, the pineal complex is a photoreceptive structure involved in regulating circadian rhythms. In zebrafish, the epithalamus is highly asymmetric along the left-right (L/R) axis (for review see (Roussigne et al., 2012)). Indeed, the habenulae display a variety of L/R differences in the expression of various markers and transgenes. The pineal complex also shows prominent L/R asymmetry, with the parapineal being located almost exclusively in a left-sided position at later stages. The parapineal does not form on the left, however, but is derived from the anterior/medial region of the pineal that delaminates and migrates leftward. During development the parapineal is crucial for the elaboration of left habenular character as laser ablation prior to its migration results in both the left and right habenula adopting largely “right” characteristics (Concha et al., 2003; Gamse et al., 2003; Aizawa et al., 2005; Bianco et al., 2008).

The signalling pathways underlying the establishment of epithalamic asymmetry in the zebrafish are being unravelled. For instance, a TGF β family member related to mammalian Nodal, Cyclops/Ndr2, is transiently expressed in the left epithalamus where it is required for biasing parapineal migration to the left (Concha et al., 2000; Liang et al., 2000). In the absence of unilateral Nodal activity, however, asymmetry develops in the epithalamus but with randomised laterality; the parapineal migrates to the left or right with a similar frequency and the habenulae develop asymmetry concordant with the handedness of the parapineal. Conversely, in embryos homozygous for a weak allele of *acerabellar* (*ace*), a mutant in the *fgf8* gene, the parapineal develops but remain at the midline and the habenulae develop symmetrically (Regan et al., 2009). The intracellular factors involved in the development of epithalamic asymmetry, however, remain largely unknown.

The Pitx2 gene encodes a homeobox transcription factor that is a target of Nodal signalling, and that is mutated in Axenfeld-Rieger syndrome patients who display ocular and craniofacial abnormalities (Semina et al., 1996; Shiratori et al., 2001). In mouse, Pitx2 mutants display phenotypes including alterations in heart positioning and right isomerisation of the lungs (Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999; Liu et al., 2001). In zebrafish embryos, two isoforms of Pitx2 are generated from a single gene through the use of distinct promoters. The expression patterns of the two isoforms are largely similar, but differences exist in structures that display asymmetries along the left-right axis; the *pitx2a* isoform is expressed in the left heart field and the *pitx2c* is expressed in the gut and in the left dorsal diencephalon (Essner et al., 2000). While studies have shown that concomitant knock-down of both the 2a and 2c isoforms phenocopies certain aspects of Axenfeld-Rieger

syndrome, nothing is known about a role for *pitx2c* in the development of L/R asymmetry in the zebrafish epithalamus (Bohnsack et al., 2012; Liu and Semina, 2012).

Here, we show that there is an increase in parapineal cell number in the *pitx2c* loss-of-function context and that this correlates with the acquisition of aspects of left character in the right habenula. Artificially restricting the number of parapineal cells in this context rescues the habenular phenotype. We propose that restricting parapineal cell number is crucial for the correct elaboration of asymmetry in the epithalamus and that Pitx2c participates in this process.

Materials and Methods

Fish lines and maintenance

Embryos were raised and staged according to standard protocols (Kimmel et al., 1995). The transgenic lines *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}*, *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}* and *TgBAC(flh:flh-Kaede)^{vu376}* have been described previously (Gilmour et al., 2002; Choo et al., 2006; Clanton et al., 2013). For later-staged embryos, PTU was used to block the formation of pigment.

In situ hybridisation (ISH) and antibody labelling

Antisense probes for *kctd8*, *kctd12.1*, *kctd12.2* (Gamse et al., 2003; Gamse et al., 2005), *nrp1a* (Kuan et al., 2007), *brn3a* (Aizawa et al., 2005), *gfi1.2* (Dufourcq et al., 2004), *lefty1* (Thisse and Thisse, 1999), *southpaw* (Long et al., 2003) and *pitx2* (Essner et al., 2000) were generated using standard procedures. Immunohistochemical stainings were performed as previously described (Masai et al., 1997), using either anti-GFP (Torrey Pines Biolabs) or anti-acetylated tubulin (Sigma) as primary antibodies with the appropriate Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (Molecular Probes). For nuclear staining, embryos were incubated in ToPro (Molecular Probes).

Volumetric analysis

To quantify volumes, *in situ* hybridisations in control and morphant embryos were performed with Fast-Red (Sigma). Confocal stacks were generated from single sections every 0.18 μm , and volumes from each stack were rendered using Volocity 3D Image Analysis Software. To determine the asymmetry index (AI) for individual embryos, the volume of the left (L) minus the right (R) expression domain was divided by the sum of both left and right volumes, i.e. $(L-R)/(L+R)$. A student t-test was performed using Prism 5 software to compare AI values between datasets (GraphPad Software).

Imaging

For all fluorescent labelling on fixed tissues, embryos were mounted in glycerol and imaged using a Leica SP5 confocal microscope with a 63 oil-immersion objective. For time-lapse analysis, embryos were mounted in 0.8% low melting point agarose and imaged on a Zeiss LSM 710 confocal microscope. To facilitate analysis, time-lapse experiments were performed in embryos carrying a *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* transgene and injected with Histone2B:RFP mRNA to label nuclei.

Morpholinos

Morpholino oligonucleotides were designed to target sequences comprising the Pitx2c ATG or a second sequence in the 5'UTR (Gene Tools, LLC); a control morpholino, where mismatches were introduced in the ATG morpholino sequence, was also designed.

Parapineal ablation and SB431542 treatment

Ablation of parapineal precursors was performed in *TgBAC(flh:flh-Kaede)^{vu376}* transgenic embryos using a Leica SP5 multiphoton confocal microscope. Embryos were subsequently grown to the appropriate stage, fixed and labelled by *in situ* hybridisation to assess parapineal cell numbers and habenular asymmetry. Nodal signalling was modulated by treating embryos with the small molecule inhibitor SB431542 from 16 hours post-fertilisation (hpf) as previously described (Inman et al., 2002; Roussigne et al., 2009).

Results and Discussion

***pitx2c* morphant embryos display partial left isomerism of the habenulae**

To address a potential role for Pitx2 in the elaboration of L/R asymmetry in the developing zebrafish brain, we employed a morpholino knock-down strategy that targets the Pitx2c isoform specifically. Morphant embryos develop in a manner globally indistinguishable from wild-type and control morphants (data not shown). Furthermore, the asymmetric expression of the Nodal pathway genes is unchanged suggesting that early events in the establishment of L/R asymmetry are unaffected (supplementary material Fig. S1)(Thisse and Thisse, 1999; Essner et al., 2000; Long et al., 2003).

Next, we analysed the expression of genes displaying L/R asymmetric patterns in the habenulae in *pitx2c* morphants. As previously described, the expression of the *potassium channel tetramerization domain containing 8 (kctd8/dexter)* gene is broader in the right than the left habenula of wild-type embryos at 72 hpf and this pattern remains unchanged in embryos injected with either a control morpholino or morpholinos targeting *pitx2c* (Fig. 1A-C',G)(Gamse et al., 2005); the expression of a second right asymmetric *kctd* gene is similarly unaffected (supplementary material Fig. S2A-C). Conversely, while in wild-type and control morphant embryos the habenular expression volumes of a third *kctd* gene, *kctd12.1/leftover*, are asymmetric with broader expression in the left habenula at 72 hpf, in *pitx2c* morphant embryos the asymmetry index is significantly reduced (Fig. 1D',E',F',G)(Gamse et al., 2003). Surprisingly, however, although *pitx2c* is expressed exclusively in the left dorsal diencephalon the shift toward symmetry in *pitx2c* morphant embryos is caused by an expansion of *kctd12.1* expression in the right rather than a decrease of expression in the left habenula (Fig. 1E versus D,F). Similarly, a habenular neuropil of left character appears in the right habenula in *pitx2c* morphants (supplementary material Fig. S2D,D'). Not all markers expressed preferentially in the left epithalamus behave in a more symmetric manner in the *pitx2c* knock-down context, however, as *nrp1a* expression remains robustly asymmetric (supplementary material Fig. S2E-G). Finally, expression of the pan-habenular marker *brn3a* is unaffected in *pitx2c* morphants at 72 hpf suggesting that overall habenular size is unchanged in the absence of Pitx2c function (supplementary material Fig. S2H-J)(Aizawa et al., 2005; Roussigne et al., 2009). Taken together, these results indicate that Pitx2c is required for the establishment of a subset of L/R habenular asymmetries.

Parapineal cell numbers are increased in *pitx2c* morphant embryos

The elaboration of left habenular character requires input from the parapineal (Concha et al., 2003; Gamse et al., 2003). Moreover, in certain mutant contexts cases of left isomerism of *kctd12.1* expression have been described that are associated with a duplication of the

parapineal on the right side of the dorsal diencephalon (Gamse et al., 2003). We, thus, asked whether the partial left habenular isomerism we detect in *pitx2c* morphant embryos correlates with changes in the development or migratory behaviour of the parapineal.

The expression of parapineal markers such, as *gfi1.2* and *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}*, is detected in morphants at 72 hpf indicating that the parapineal is formed in the *pitx2c* knock-down context (Fig. 2A,B; supplementary material Fig. S3A,B)(Dufourcq et al., 2004; Choo et al., 2006). Furthermore, reduction of *pitx2c* function does not affect the orientation of parapineal migration. However, we found that expression of the *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* transgene appears in parapineal cells with an approximately twelve hour delay in *pitx2c* morphants relative to wild-type (Fig. 2D-D''' versus 2E-E'''); robust expression of GFP from the *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* is detected at later stages in *pitx2c* morphants (data not shown). These data suggest that Pitx2c is required for the correct schedule of neural specification in the parapineal.

We also found that the number of cells in the parapineal in *pitx2c* morphants differs from wild-type embryos. Indeed, while 17+/-0.94 and 9+/-0.75 cells are labelled respectively with *gfi1.2* and *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}* in controls, a significantly larger number of cells is labelled in *pitx2c* morphants with these markers (25+/-1.59 and 12+/-1.57 cells; Fig. 2C; supplementary material Fig. S3). To address when supernumerary parapineal cells appear, we performed time-lapse confocal analysis on wild-type and *pitx2c* morphant embryos starting from 24 hpf, a stage just prior to parapineal migration (Fig. 2D-E'''). At this stage, no difference in the number of parapineal cells was detected between wild-type and *pitx2c* morphant embryos indicating that reducing *pitx2c* function does not influence the initial number of parapineal cells (Fig. 2D,E,F). As the parapineal migrates, however, supernumerary cell divisions lead to a significant increase in the number of cells per parapineal in morphant versus control embryos (Fig. 2F; supplementary material Movies S1 versus S2 and S3). The extra cell divisions tend to occur during the first 6 hours of migration but can be detected up to 14 hours after migration has initiated. Thus, Pitx2c limits the mitotic capacity of parapineal cells once they have been determined.

In the absence of late Nodal activity *pitx2c* expression in the epithalamus is lost but, paradoxically, this does not result in an enlarged parapineal (supplementary material Fig. S4) (Concha et al., 2000; Liang et al., 2000). One explanation could be that Nodal signalling promotes an increase in cell number in the parapineal and that Pitx2c acts to impede this activity; in the absence of epithalamic Nodal activity this level of control would no longer be required. If the threshold of Nodal signalling needed to promote increased parapineal cell number is higher than that needed to drive *pitx2c* expression then suboptimal levels of Nodal signalling should lead to a reduction in the number of parapineal cells. To explore this, we modulated Nodal signalling with varying concentrations of the small molecule inhibitor

SB431542 and monitored parapineal cell number. Mock treatment with DMSO or treatment with 100 or 75 μ M SB431542 had no effect on parapineal size (Fig. 3E). Conversely, embryos treated with SB431542 at 50 μ M show a significant reduction in the number of *gfi1.2*+ parapineal cells (Fig. 3A,B,E); treatment with 25 μ M SB431542 had a small but statistically insignificant effect on parapineal cell number (Fig. 3E). The various SB431542 treatment regimes have a graded effect on the expression of *pitx2c* at 24 hpf (supplementary material Fig. S5). If residual Pitx2c restricts the number of parapineal cells at suboptimum levels of Nodal activity, knocking down Pitx2c function in this context should restore wild-type cell counts. Indeed, while *pitx2c* morpholino injection into DMSO treated embryos leads to an increase in parapineal cell number similar to that described above, *pitx2c* morphant embryos treated with 50 μ M SB431542 display wild-type numbers of parapineal cells (Fig. 3C,D,F). From these results, we propose that an equilibrium exists between Nodal and Pitx2c activity that sets an upper limit of parapineal cell number (Fig. 3G).

Restricting parapineal cell numbers in *pitx2c* morphants rescues habenular asymmetry

To begin to address whether the partial left habenular isomerism detected in *pitx2c* morphants is due to the concomitant changes detected in the parapineal, we performed parapineal ablations. In wild-type embryos, ablation of parapineal precursors prior to their migration leads to a “double right” pattern of *kctd12.1* expression (Fig. 4A,B)(Concha et al., 2003; Gamse et al., 2003); volumetric analysis shows that such ablations produce a more symmetric *kctd12.1* expression pattern (Fig. 4A',B',E). Ablation of either the left or right half of the parapineal anlage prior to migration had no effect on the resulting asymmetric development of the habenulae (Fig. 4C-D',E)(Concha et al., 2003). Whereas a “double left” pattern of *kctd12.1* expression is detected in *pitx2c* morphants, complete ablation of parapineal precursors in this context results in a “double right” *kctd12.1* phenotype (Fig. 4E-G'). Thus, in *pitx2c* morphants the expansion of left character in the right habenula requires the parapineal.

If the increase in parapineal cell number underlies the habenular phenotype in *pitx2c* morphants, we hypothesised that reducing it in this context should rescue habenular asymmetry. For this, we performed ablations of either the left or right pool of parapineal precursors in the *pitx2c* morphant context. Such ablations produce residual parapineals whose cell number is sufficient for imposing correct habenular asymmetry in wild-type embryos (supplementary material Fig. S6). We found that L/R asymmetry of the expression of *kctd12.1* is efficiently restored in embryos where the parapineal has been partially ablated (Fig. 4E,H-I'). Taken together, our results suggest that Pitx2c restricts the number of cell of

the parapineal and that this appears essential for the correct elaboration of habenular asymmetry.

Conclusion

Previous studies suggest that there is a minimum parapineal cell number required for the correct elaboration of asymmetry in the zebrafish epithalamus (Concha et al., 2003; Gamse et al., 2003). Here, we provide the first evidence that limiting parapineal cell number is equally important. Our results reveal one mechanism for restricting the number of parapineal cells involves Pitx2c, potentially via negative feedback against Nodal activity. It waits to be seen if a similar role for Pitx2 exists in other tissues displaying L/R asymmetry.

Acknowledgements

We are grateful to Julie Batut, Catherine Danesin, Véronique Duboc and members of the Blader lab for critical reading of the manuscript and Rebecca Burdine, Vladimir Korzh and Darren Gilmour for reagents and fish lines. We would like to thank Stéphane Relexans for expert fish husbandry.

Funding

This work was supported by the CNRS, INSERM, Université de Toulouse III (UPS), Fondation pour la Recherche Médicale, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, Fondation ARC and the French Ministère de la Recherche to PB and by NIH/NICHHD grant HD054534 to JTG.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

References

- Aizawa, H., Bianco, I. H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M. L., Russell, C., Wilson, S. W. and Okamoto, H.** (2005) Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus, *Curr Biol* 15(3): 238-43.
- Bianco, I. H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J. D. and Wilson, S. W.** (2008) Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology, *Neural Dev* 3: 9.
- Bohnsack, B. L., Kasprick, D. S., Kish, P. E., Goldman, D. and Kahana, A.** (2012) A zebrafish model of axenfeld-rieger syndrome reveals that pitx2 regulation by retinoic acid is essential for ocular and craniofacial development, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(1): 7-22.
- Choo, B. G., Kondrichin, I., Parinov, S., Emelyanov, A., Go, W., Toh, W. C. and Korzh, V.** (2006) Zebrafish transgenic Enhancer TRAP line database (ZETRAP), *BMC Dev Biol* 6: 5.
- Clanton, J. A., Hope, K. D. and Gamse, J. T.** (2013) Fgf signaling governs cell fate in the zebrafish pineal complex, *Development* 140(2): 323-32.
- Concha, M. L., Burdine, R. D., Russell, C., Schier, A. F. and Wilson, S. W.** (2000) A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain, *Neuron* 28(2): 399-409.
- Concha, M. L., Russell, C., Regan, J. C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D. T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E. et al.** (2003) Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality, *Neuron* 39(3): 423-38.
- Concha, M. L. and Wilson, S. W.** (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates, *J Anat* 199(Pt 1-2): 63-84.

Dufourcq, P., Rastegar, S., Strahle, U. and Blader, P. (2004) Parapineal specific expression of *gfi1* in the zebrafish epithalamus, *Gene Expr Patterns* 4(1): 53-7.

Essner, J. J., Branford, W. W., Zhang, J. and Yost, H. J. (2000) Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms, *Development* 127(5): 1081-93.

Gamse, J. T., Kuan, Y. S., Macurak, M., Brosamle, C., Thisse, B., Thisse, C. and Halpern, M. E. (2005) Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target, *Development* 132(21): 4869-81.

Gamse, J. T., Thisse, C., Thisse, B. and Halpern, M. E. (2003) The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon, *Development* 130(6): 1059-68.

Gilmour, D. T., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C. (2002) Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system, *Neuron* 34(4): 577-88.

Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. and Hill, C. S. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7, *Mol Pharmacol* 62(1): 65-74.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev Dyn* 203(3): 253-310.

Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y. et al. (1999) Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism, *Development* 126(24): 5749-58.

Kuan, Y. S., Yu, H. H., Moens, C. B. and Halpern, M. E. (2007) Neuropilin asymmetry mediates a left-right difference in habenular connectivity, *Development* 134(5): 857-65.

Liang, J. O., Etheridge, A., Hantsoo, L., Rubinstein, A. L., Nowak, S. J., Izpisua Belmonte, J. C. and Halpern, M. E. (2000) Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ, *Development* 127(23): 5101-12.

Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G. (1999) *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis, *Nature* 401(6750): 279-82.

Liu, C., Liu, W., Lu, M. F., Brown, N. A. and Martin, J. F. (2001) Regulation of left-right asymmetry by thresholds of *Pitx2c* activity, *Development* 128(11): 2039-48.

Liu, Y. and Semina, E. V. (2012) *pitx2* Deficiency results in abnormal ocular and craniofacial development in zebrafish, *PLoS One* 7(1): e30896.

Long, S., Ahmad, N. and Rebagliati, M. (2003) The zebrafish nodal-related gene *southpaw* is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry, *Development* 130(11): 2303-16.

- Lu, M. F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L. and Martin, J. F.** (1999) Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development, *Nature* 401(6750): 276-8.
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W.** (1997) floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain, *Neuron* 18(1): 43-57.
- Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C. and Wilson, S. W.** (2009) An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry, *Neuron* 61(1): 27-34.
- Roussigne, M., Bianco, I. H., Wilson, S. W. and Blader, P.** (2009) Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei, *Development* 136(9): 1549-57.
- Roussigne, M., Blader, P. and Wilson, S. W.** (2012) Breaking symmetry: the zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain, *Dev Neurobiol* 72(3): 269-81.
- Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L., Small, K. W., Datson, N. A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B. U. et al.** (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome, *Nat Genet* 14(4): 392-9.
- Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M. and Hamada, H.** (2001) Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2, *Mol Cell* 7(1): 137-49.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (1999) Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction, *Development* 126(2): 229-40.

Figure legends

Figure 1. Partial left isomerisation in *pitx2c* morphants.

(A to C) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *kctd8* in wild-type, *pitx2c* morphant and control morphant embryos at 72 hpf. No differences are detected between the different contexts.

(A' to C') 3D renderings of volumes of *kctd8* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(D to F) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *kctd12.1* in wild-type, *pitx2c* morphant and control morphant embryos at 72 hpf. *pitx2c* morphants display broader expression of *kctd12.1* in the right habenula than either of the control contexts.

(D' to F') 3D renderings of volumes of *kctd12.1* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(G) Asymmetry index (AI) with regard to the volumes of *kctd8* or *kctd12.1* expression for individual wild-type (wt), control or *pitx2c* morphant embryos. Horizontal black line represents the median AI for each context and the dotted line indicates symmetry. Only the AI for the expression of *kctd12.1* in *pitx2c* morphants is significantly more symmetric than control conditions; ***P<0.001 using a t-test.

Embryos are view dorsally with the anterior to the top.

Figure 2. *pitx2c* morphants display larger parapineals

(A,B) Single confocal sections of the pineal complex showing *in situ* hybridisation against *gfi1.2* in control and *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf. The outline of the pineal gland is highlighted with a dotted line.

(C) Counts of cell expressing *gfi1.2* in control and *pitx2c* morphants. The number of *gfi1.2*-positive cells is significantly increased in the morphant context; **P<0.01 using a t-test. Error bars represent s.e.m.

(D-D''') Single confocal sections extracted from a time-lapse series showing the migrating parapineal (indicated with a dotted line) in a *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* embryo; nuclei are labelled in red with Histone2B:RFP. At 24 hpf (D), the parapineal has only just delaminated from the anterior region of the pineal complex. Leftward migration is clearly engaged at 6 hours (D') and continues throughout the analysis (D'' and D'''). Time after the initiation of the analysis is indicated on each frame.

(E to E''') Single confocal sections extracted from a time-lapse series showing the migrating parapineal (indicated with a dotted line) in a *pitx2c* morphant embryo carrying the *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* transgene; nuclei are labelled in red with Histone2B:RFP. As in wild-type

siblings, *pitx2c* morphant parapineals have migrated to the left at 6 hours. Time after the initiation of the analysis is indicated on each frame.

(F) Numbers of cells in the parapineal during migration in wild-type (green) and *pitx2c* morphant embryos (orange). A statistically significant difference in parapineal cell numbers is detected in the morphant versus the control as early as 2 hours into the time-lapse datasets. * $P > 0.1$; *** $P < 0.001$ using a two-way repeated measures ANOVA test. Error bars represent s.e.m.

Embryos are view dorsally with the anterior to the top.

Figure 3. Modulating Nodal signalling reduces parapineal cell number

(A-D) Single confocal sections of the pineal complex showing *in situ* hybridisation against *gfi1.2* in mock treated, 50 μ M SB431542 treated, mock treated/*pitx2c* morphant and 50 μ M SB431542 treated/*pitx2c* morphant embryos at 72 hpf. The outline of the pineal gland is highlight with a dotted line.

(E) Counts of cell expressing *gfi1.2* in mock treated and SB431542 treated embryos. The number of *gfi1.2*-positive cells is significantly decreased only when embryos are treated with 50 μ M SB431542; *** $P < 0.001$ using a t-test. Error bars represent s.e.m.

(F) Counts of cells expressing *gfi1.2* in mock-treated and SB431542 treated embryos injected with *pitx2c* morpholino. Whereas DMSO treated morphant embryos leads to an increase in parapineal cell number, morphants embryos treated with 50 μ M of SB431542 display wild-type numbers of parapineal cells; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ using a t-test. Error bars represent s.e.m.

(G) Model for the antagonism between Nodal and Pitx2c. Whereas Nodal activates *pitx2c* expression that subsequently limits parapineal cell numbers, in parallel a second target of Nodal signalling (X) promotes an increase in parapineal cell numbers. The balance between these two Nodal effectors provides fine control over the maximum cell number of the parapineal.

Figure 4. Restricting parapineal cell number rescues habenular asymmetry.

(A-D) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *kctd12.1* in wild-type embryos at 72 hpf with no ablation (A), complete parapineal ablation (B) or partial ablation of the right (C) or left (D) half of the parapineal anlage. While complete parapineal ablation induces right isomerisation of *kctd12.1* expression, no differences are detected in partial ablations.

(A'-D') 3D renderings of volumes of *kctd12.1* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(E) Asymmetry index (AI) with regard to the volume of *kctd12.1* expression for individual wild-type (wt) or morphant embryos with complete or partial parapineal ablations. Horizontal black line represents the median AI for each context. While complete ablation of the parapineal renders the expression of *kctd12.1* significantly less asymmetric, partial ablation in *pitx2c* morphants restores asymmetry; **P<0.01; ***P<0.001 using a t-test.

(F-I) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *kctd12.1* in *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf with no ablation (F), complete parapineal ablation (G) or partial ablation of the right (H) or left (I) half of the parapineal anlage. While *pitx2c* morphants display left isomerisation of *kctd12.1* expression and complete parapineal ablation induces right isomerisation, partial ablations return the expression pattern of *kctd12.1* to a wild-type pattern.

(F'-I') 3D renderings of volumes of *kctd12.1* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

Embryos are view dorsally with the anterior to the top.

Supplementary Figure 1.

No changes are detected in the expression of the Nodal family gene *southpaw* in the left lateral plate mesoderm at 18 hpf, or in the expression of *pitx2c* and the Nodal feedback inhibitor *lefty1* in the left dorsal diencephalons at 24 hpf in *pitx2c* morphants relative to wild-type and control morphants suggesting that the establishment of L/R asymmetry is not generally affected.

Supplementary Figure 2.

(A, B) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *kctd12.2* in wild-type and *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf.

(A', B') 3D renderings of volumes of *kctd12.2* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(C) Asymmetry index (AI) with regard to the volume of *kctd12.2* expression for individual wild-type or *pitx2c* morphant embryos. Horizontal black line represents the median AI for each context: note that the AI is negative because the asymmetry is biased to the right. No significant difference between wild-type or *pitx2c* morphant embryos is detected.

(D, D') Single confocal sections through the epithalamus showing the habenular neuropil detected by immunostaining against acetylated tubulin at 72 hpf. While the neuropil of wild-type embryos is asymmetric with a left bias (large versus small arrows), symmetric anti-acetylated tubulin staining is detected in *pitx2c* morphant embryos (two large arrows).

(E, F) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *nrx1a* in wild-type and *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf.

(E', F') 3D renderings of volumes of *nrp1a* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(G) Asymmetry index with regard to the volume of *nrp1a* expression for individual wild-type or *pitx2c* morphant embryos. Horizontal black line represents the median AI for each context. No significant difference between wild-type or *pitx2c* morphant embryos is detected.

(H, I) Single confocal sections of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *brn3a* in wild-type and *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf.

(H', I') 3D renderings of volumes of *brn3a* expression in the habenulae of the respective confocal acquisition sets.

(J) Asymmetry index with regard to the volume of *brn3a* expression for individual wild-type or *pitx2c* morphant embryos. Horizontal black line represents the median AI, which are in both contexts close to zero reflecting that they are virtually symmetric. No significant difference between wild-type or *pitx2c* morphant embryos is detected.

Embryos are view dorsally with the anterior to the top.

Supplementary Figure 3.

(A,B) Confocal projections showing the expression of GFP from the *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}* transgene in control and *pitx2c* morphant embryos at 72 hpf. The outline of the pineal gland is highlight with a dotted line.

(C) Counts of cell expressing GFP in control and *pitx2c* morphants. The number of GFP-positive cells is significantly increased in the morphant context; **P<0.01 using a t-test. Error bars represent s.d.

Supplementary Figure 4.

(A,A') Frontal view of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *pitx2c* at 24 hpf in mock-treated embryos (A) or those treated with SB543421 at 100 μ M (A').

(B,B') Single confocal sections of the parapineal showing the expression of GFP from the *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}* transgene in mock-treated embryos (B) or those treated with SB543421 at 100 μ M (B'). The outline of the pineal gland is highlight with a dotted line.

(C) Counts of cell expressing the *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}* transgene in mock-treated and SB543421 treated embryos. The number of GFP positive cells is unaffected by treatment with SB542431. Error bars represent s.d.

Supplementary Figure 5.

(A-C) Frontal view of the epithalamus showing *in situ* hybridisation against *pitx2c* at 24 hpf. Expression can be qualified as Strong (A), Weak (B) or Absent (C).

(D) Quantification of *pitx2c* expression classes presented in (A-C) in mock-treated and embryos treated with varying concentrations of SB431542 from 16 to 72 hpf .

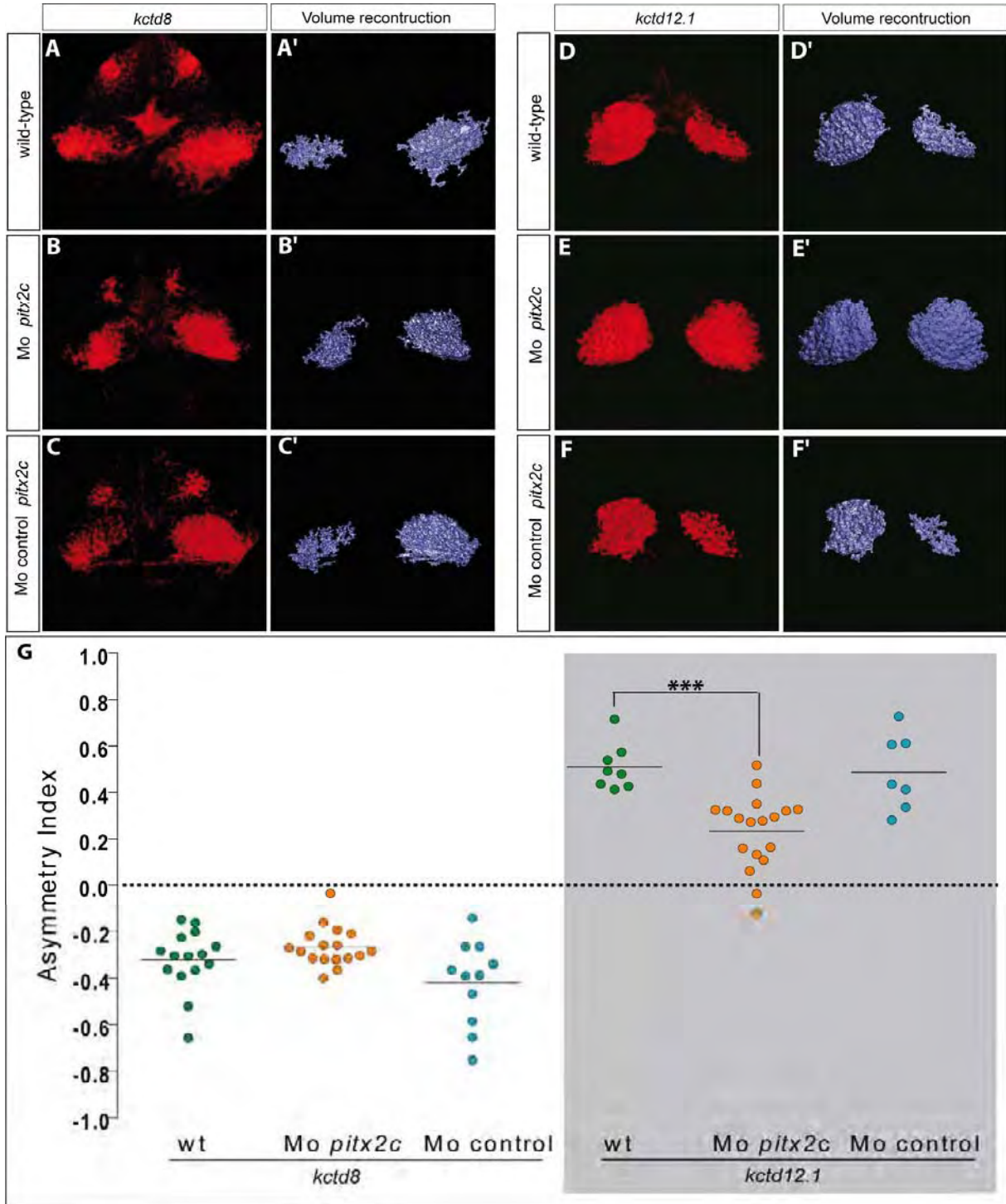
Supplementary Figure 6.

Counts of cells expressing *gfi1.2* in control (green) and *pitx2c* morphant (orange) embryos having undergone no ablation, complete parapineal ablation or partial ablation of the right or left half of the parapineal anlage immediately prior to parapineal migration. Partial ablations in *pitx2c* morphants produce residual parapineals whose cell counts falls within the range sufficient for imposing correct habenular asymmetry in wild-type embryos (highlighted in gray). Error bars represent s.d.

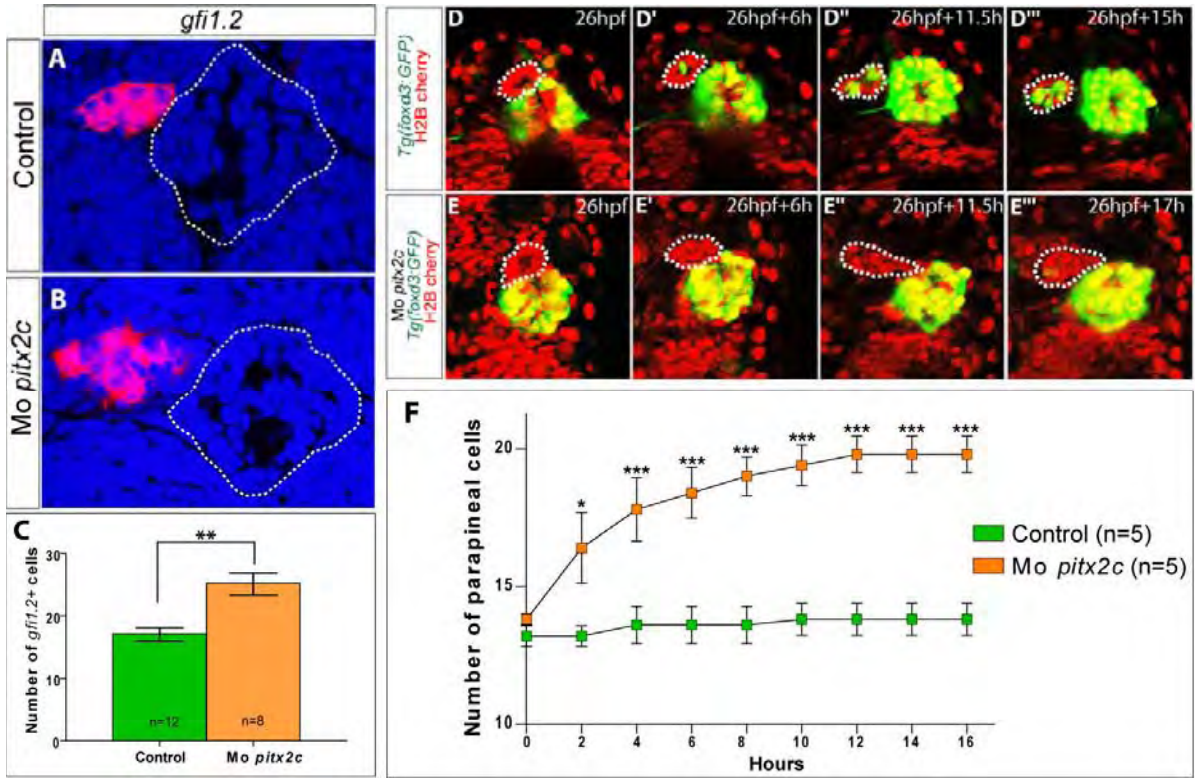
Supplementary Movies 1 (wild-type), 2 (Mo *pitx2c*) and 3 (Mo *pitx2c*).

Time-lapse movies showing the migrating parapineal in wild-type and a *pitx2c* morphant embryo carrying the *Tg(foxd3:GFP)^{zf15}* transgene; nuclei are labelled with Histone2B:RFP and false coloured in grey. The movies were generated for a projection of 3 Z-sections at each time point. While in the wild-type embryos one cell division is noted during the movie, in the Mo *pitx2c* embryos 4 divisions can be seen; divisions are highlighted with purple arrows that appear to split at the time of division. Films were initiated between 24-26 hpf and the initial frame is annotated to indicate the parapineal (dotted line).

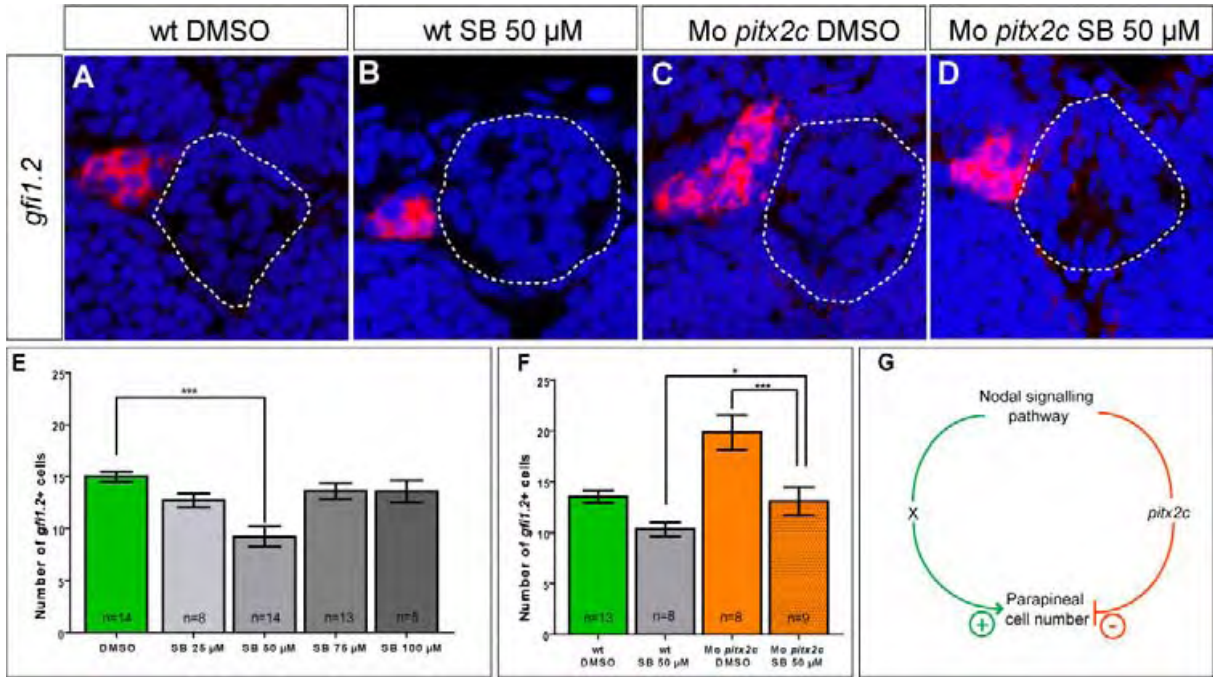
Garric et al. Figure 1



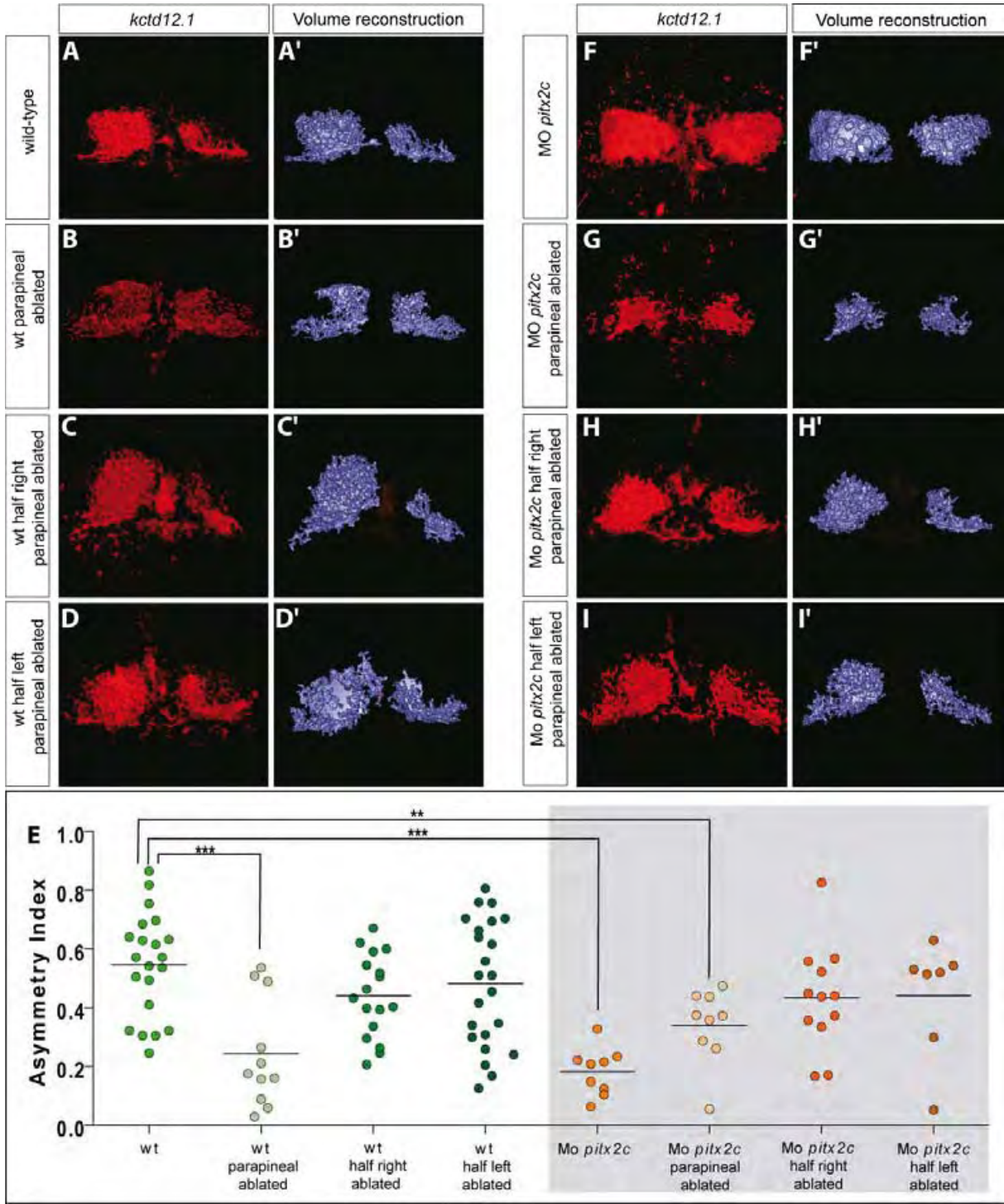
Garric et al. Figure 2



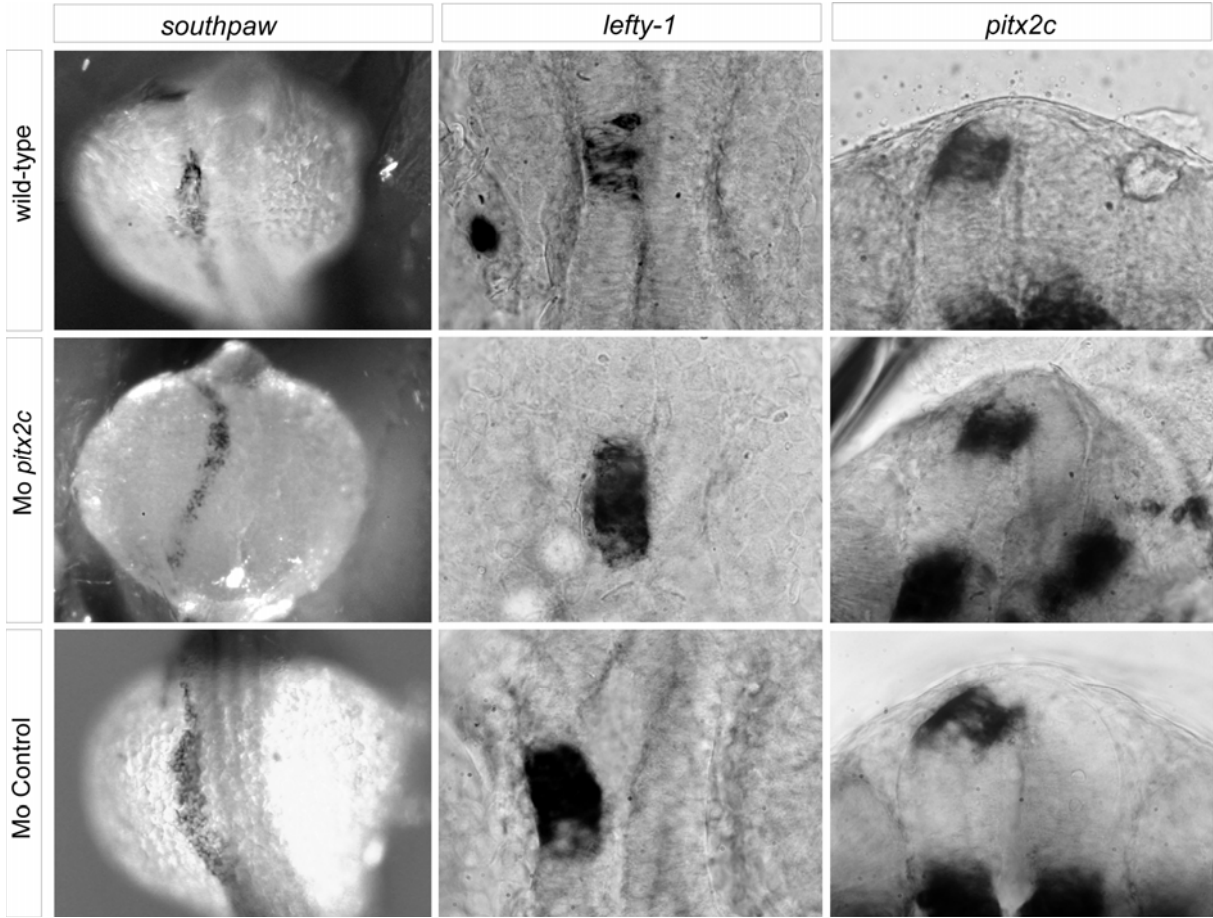
Garric et al. Figure 3

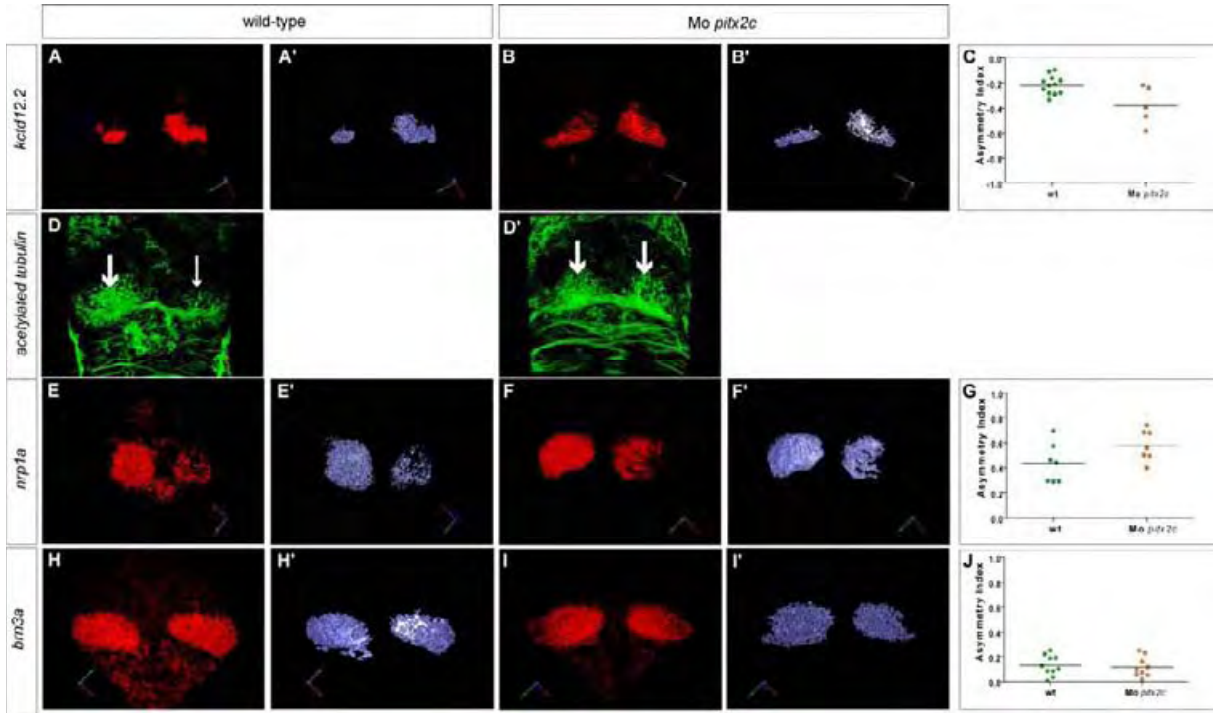


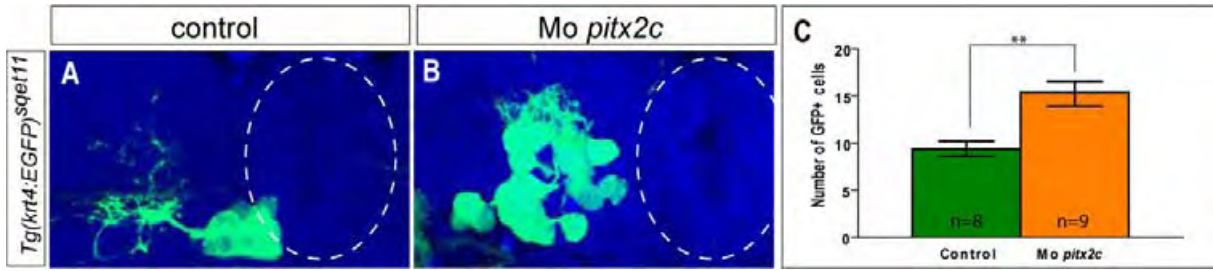
Garric et al. Figure 4

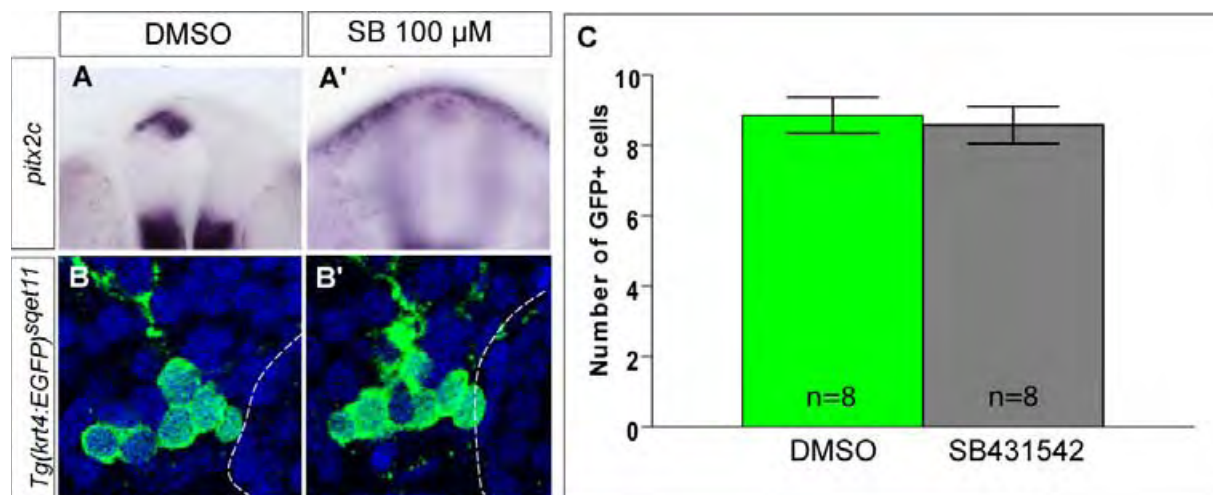


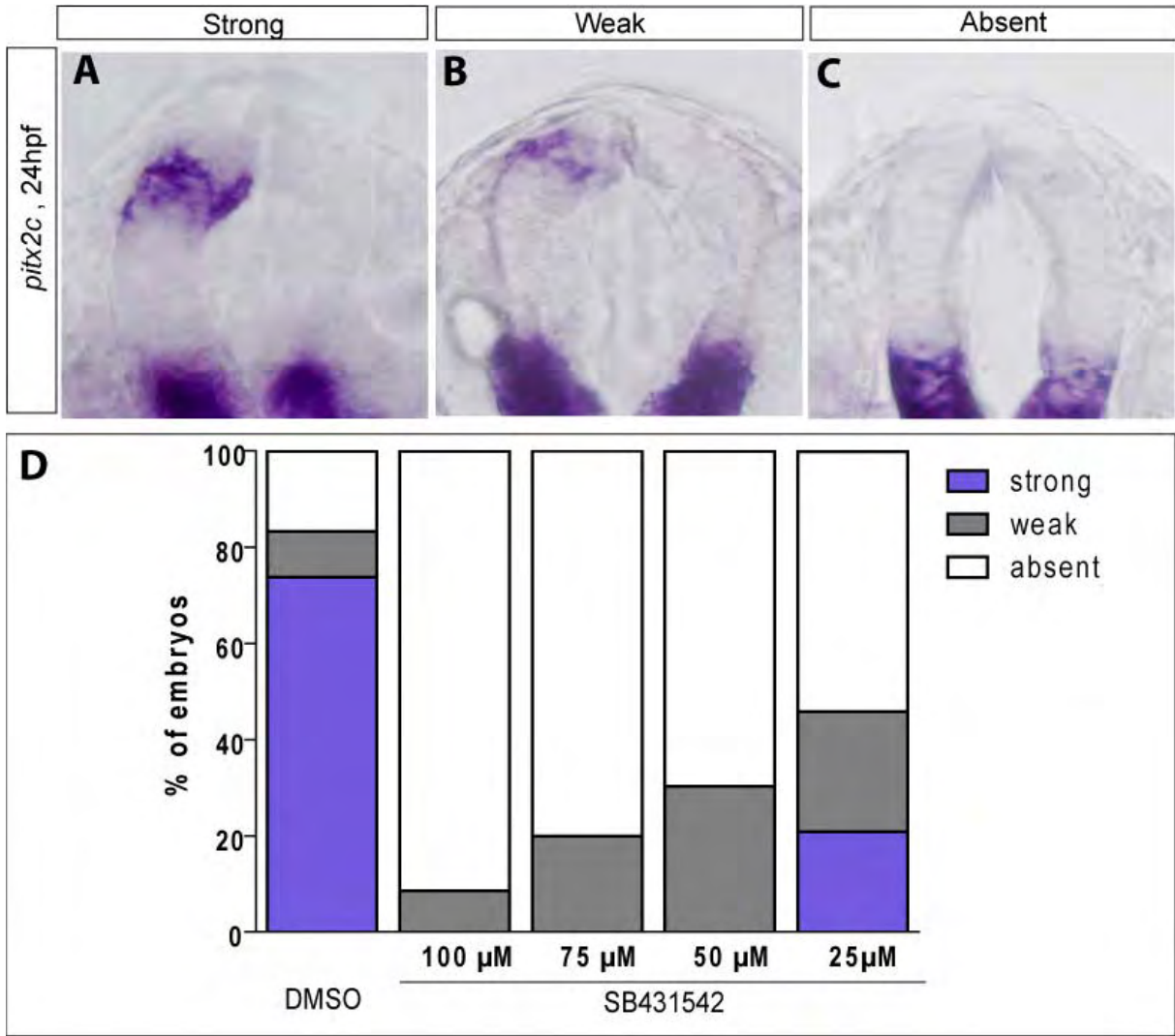
Garric et al. Figure Suppl. 1

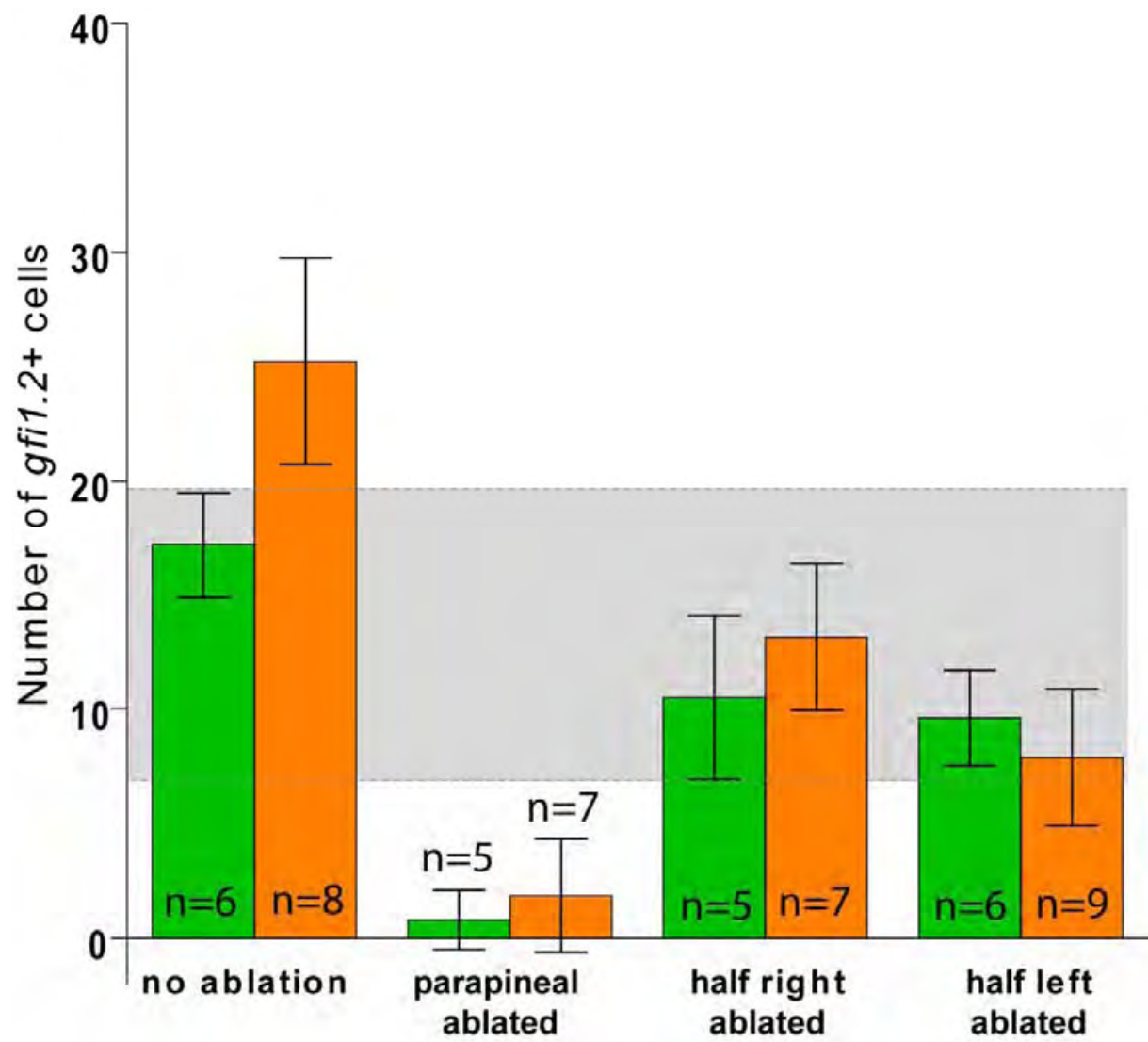












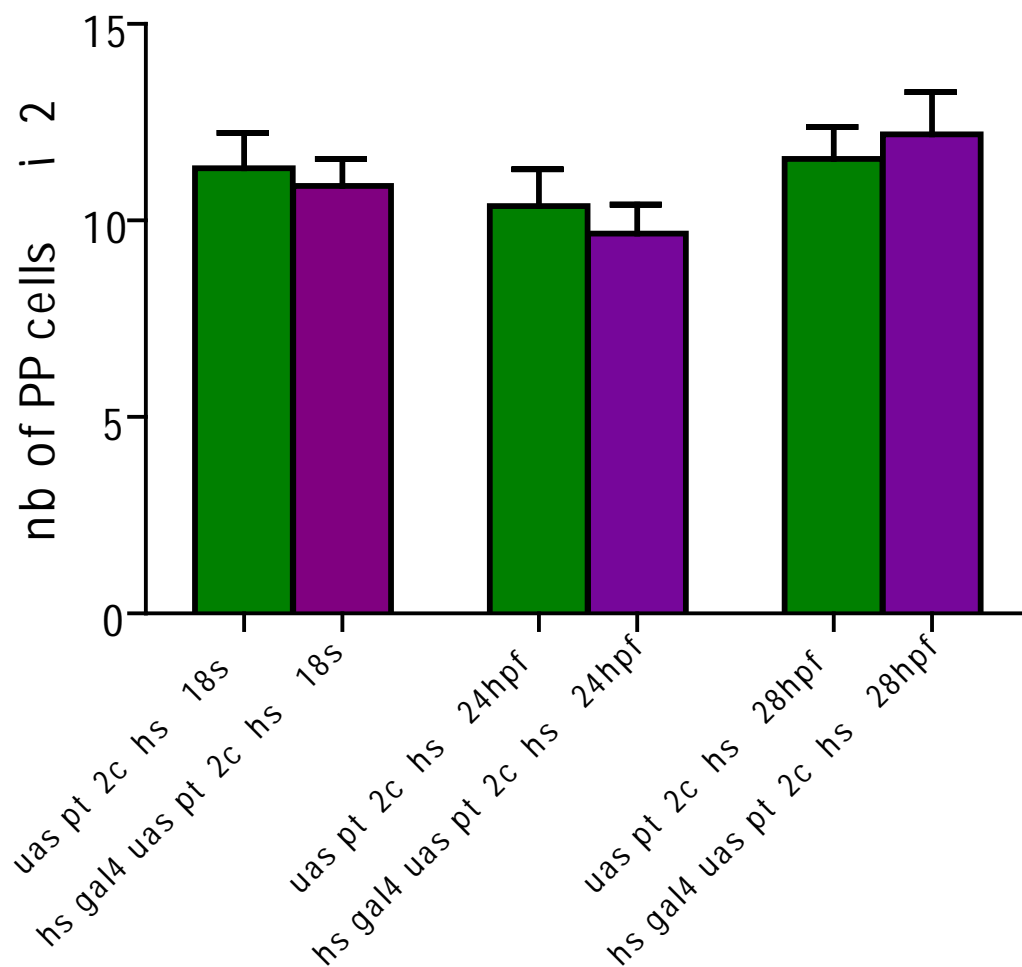


Figure 37 : La surexpression de *ptx2c* ne réduit pas le nombre de cellules composant la glande paracrine.

Le graphe représente le nombre de cellules de la paracrine marquées avec *gfi1.2* dans des embryons contrôles (vert) ou *Tg(hs:gal4;uas:ptx2c)* (violet) sur lesquels des chocs thermiques (heat chos (hs)) ont été réalisés à différents temps (de 18 à 28hpf). La comparaison des moyennes n'est pas significativement différente en utilisant un t-test ($p > 0.05$).

III. 2. Résultats complémentaires

III.2.1. La surexpression de *pitx2c* ne restreint pas la taille de la parapinéale

Pitx2c est donc responsable du contrôle de la taille de la parapinéale dans un contexte sauvage. Pour savoir si *pitx2c* était suffisant pour restreindre cette prolifération, nous avons réalisé des expériences de gain de fonction de *pitx2c* puis quantifié le nombre de cellules de la parapinéale. Le seul moment où *pitx2c* pourrait agir sur le nombre de cellules de la parapinéale se situerait autour de 18s car c'est à ce stade que *pitx2c* est exprimé dans le tiers antérieur du complexe pinéal qui contient les progéniteurs de la glande parapinéale. Nous n'avons pas détecté de différence significative dans le nombre de cellules de la parapinéale entre les embryons *Tg(hs:gal4;uas:pitx2c)* et les embryons non transgéniques ayant subi le même traitement (Figure 37). Pour savoir si *pitx2c* était requis plus tard pour déterminer le nombre de cellules de la glande parapinéale, des chocs thermiques ont été réalisés à des stades plus tardifs. L'expression forcée de *pitx2c* à 24 et 28hpf n'a cependant pas modifié la taille de la parapinéale. La surexpression de *pitx2c* n'est donc pas suffisante pour restreindre le nombre initial de cellules de la parapinéale pendant leur spécification. Par ailleurs, dans la perte de fonction *pitx2c*, le nombre de cellules initial, avant migration, est semblable à celui observé dans les individus sauvages. Cela suggère l'existence d'un nombre minimal de cellules défini par un autre facteur que *pitx2c*.

III.2.2. *pitx2c* et *tbx2b* contrôlent indépendamment la taille de la glande parapinéale

D'autres facteurs sont connus pour influencer sur la taille de la parapinéale : la perte de fonction du facteur de transcription *tbx2b* induit une réduction drastique du nombre de cellules de la parapinéale (Snelson et al., 2008b).

Dans le but d'établir si une régulation entre *pitx2c* et *tbx2b* existe, nous avons bloqué l'action de *tbx2b* par injection de morpholino et examiné l'expression de *pitx2c* dans ce contexte à 24hpf. Nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de *pitx2c* dans les embryons morphants *tbx2b*. Inversement, nous avons contrôlé l'expression de *tbx2b* dans

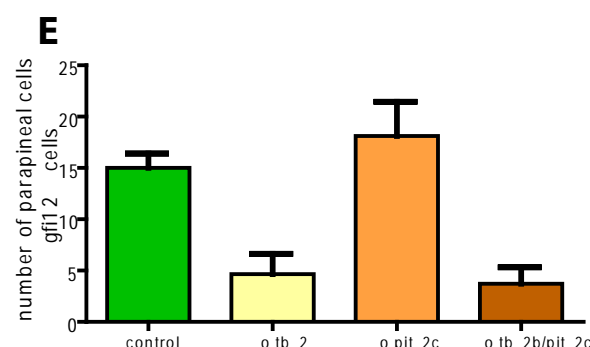
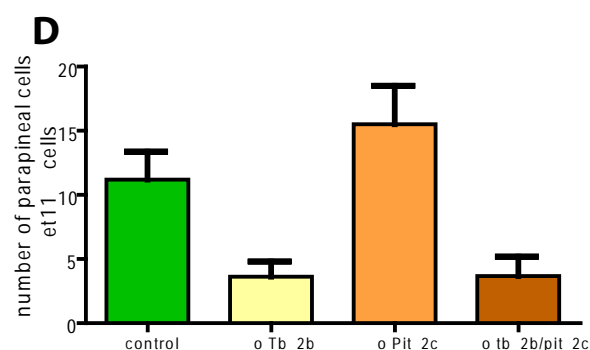
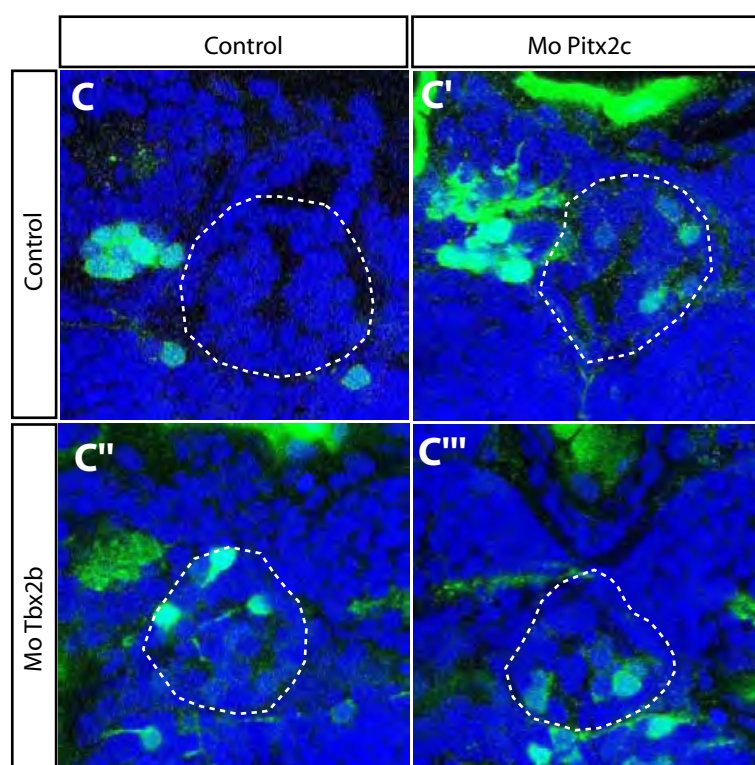
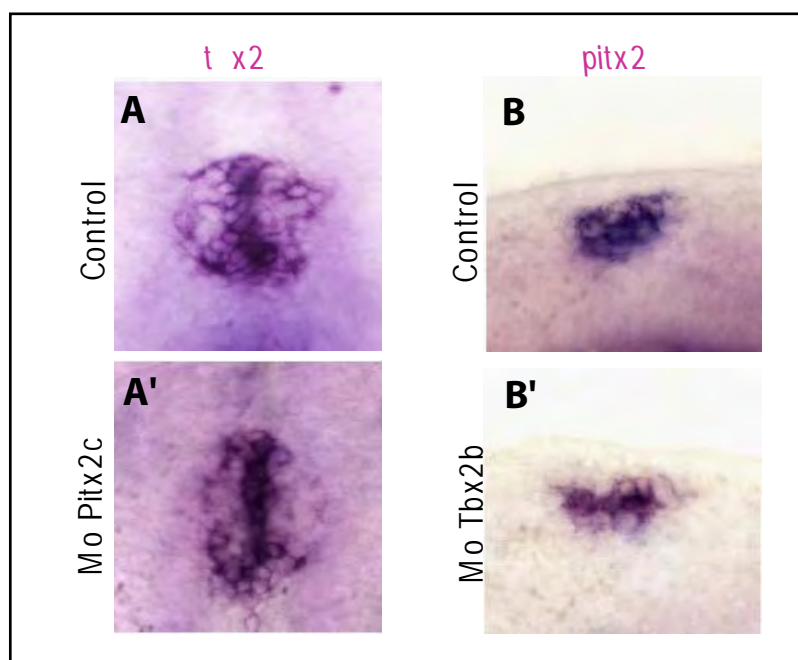


Figure 38 : Tbx2b est épistatique à Pitx2c dans le contrôle du nombre de cellules de la glande parapinéale.

A-A') Hybridation *in situ* de *tbx2b* en vue dorsale dans des embryons de 24hpf sauvages ou injectés avec Mo1 *pitx2c* au stade une cellule. La perte de fonction de *pitx2c* n'induit pas de changement dans l'expression de *tbx2c* dans l'épithalamus.

B-B') Hybridation *in situ* de *pitx2c* en vue latérale dans des embryons de 24hpf sauvages ou injectés avec le morpholino dirigé contre *tbx2b* au stade une cellule. La perte de fonction de *tbx2b* n'induit pas de changement dans l'expression de *pitx2c* dans l'épithalamus.

C-C''') Embryons *Tg(et11:GFP)* à 3dpf. Un faible nombre de cellules GFP sont détectées dans les conditions perte de fonction *tbx2b* et double perte de fonction *tbx2b/pitx2c*.

D) Nombre de cellules de la prapinéale quantifiées dans la lignée transgénique *Et(krt4:EGFP)^{sqet11}*

E) Nombre de cellules de la prapinéale exprimant *gf11.2*.

Dans les deux quantifications, le nombre de cellules dans la condition double perte de fonction n'est pas significativement différent de celui dans la perte de fonction de *tbx2b* seul.

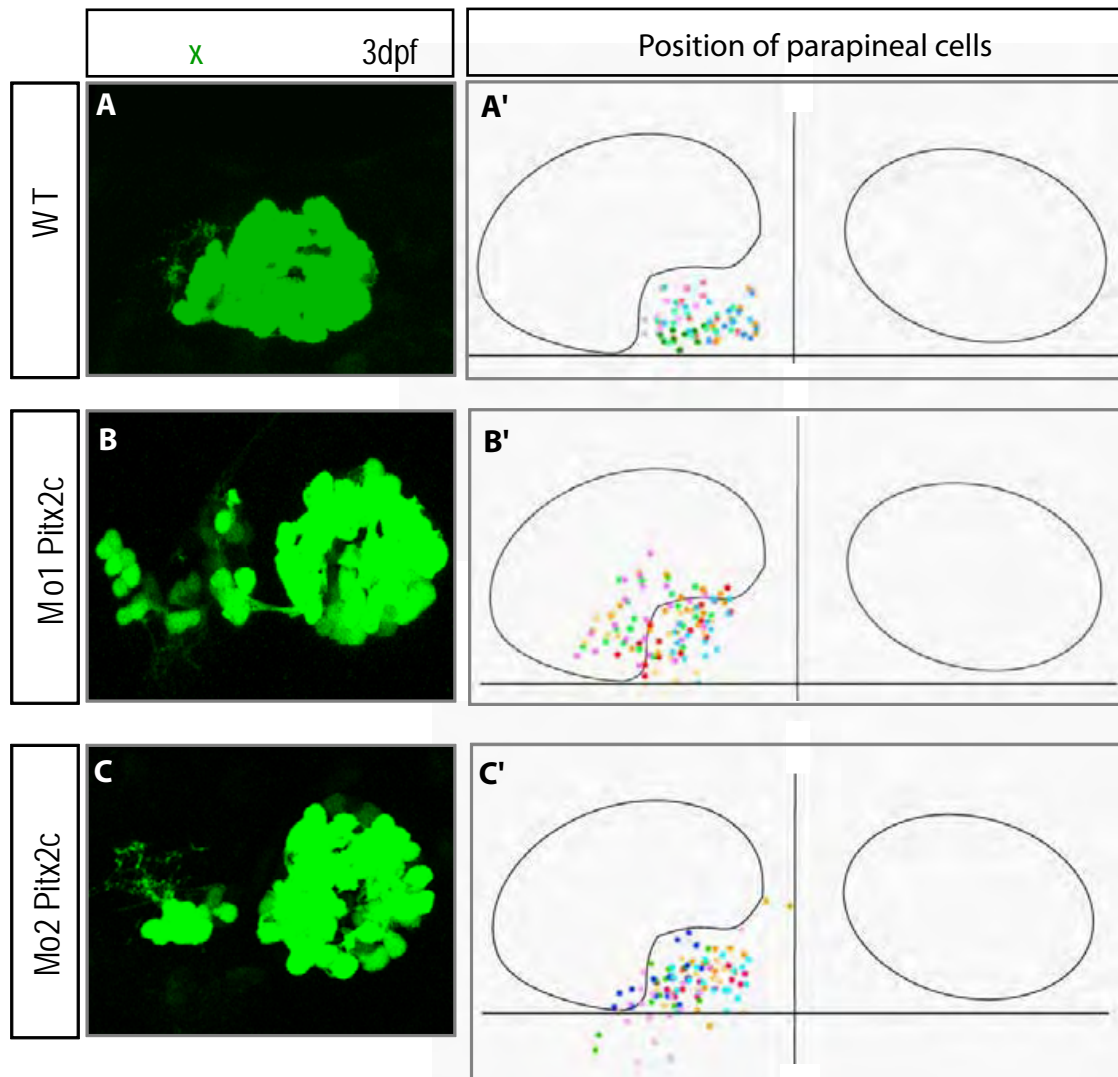


Figure 39 : *pitx2c* joue un rôle dans la cohésion des cellules de la glande parapinéale.

A-A') Dans les embryons sauvages, à 3dpf dans la lignée transgénique *Tg(foxD3:GFP)*, les cellules de la glande parapinéale forment un groupe cohésif proche de la glande pinéale.

B-C') Dans les embryons morphants *pitx2c*, les cellules de la glande parapinéale ont migrées vers la gauche mais les cellules ne sont pas cohésives. Certaines envahissent même l'habenula gauche.

A'-B'-C') Représentation de la position de chaque cellule de la glande parapinéale. Chaque point représente une cellule et chaque couleur représente un individu.

des embryons injectés avec le morpholino *pitx2c*. Dans ce contexte, nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de *tbx2b* (Figure 38 A-B'). Ces résultats indiquent que dans l'épithalamus, *pitx2c* n'induit pas l'expression de *tbx2b* et *tbx2b* n'induit pas l'expression de *pitx2c*.

Pitx2 et Tbx2b pourraient contrôler le nombre de cellules de la parapinéale via des voies de régulation indépendantes. Sachant que les pertes de fonction d'un seul des deux facteurs induisent des phénotypes opposés, la perte simultanée des deux facteurs de transcription permettrait de savoir quel facteur est en amont de l'autre. Nous avons réalisé une double perte de fonction grâce à l'injection concomitante des morpholino dirigés contre *tbx2b* et *pitx2c*. Les cellules ont été quantifiées grâce au facteur spécifique *gfi1.2* ou au transgène Tg(*Et(krt4:EGFP)^{sget11}*) marquant une partie des cellules de la parapinéale. Alors que la perte de fonction *tbx2b* réduit drastiquement le nombre de cellules et que la perte de *pitx2c* l'augmente, la double perte des facteurs de transcription phénocopie la perte de *tbx2b* seule. En effet, le nombre de cellules n'est pas statistiquement différent du nombre observé dans les embryons morphants *tbx2b* (Figure 38 C-E). Il semble donc que le facteur *tbx2b* soit épistatique à *pitx2c*. Tbx2b pourrait définir un nombre initial de progéniteurs de cellules de la parapinéale et *pitx2c* en contrôler la prolifération avant la différenciation. Auquel cas, dans la double perte *pitx2c/tbx2b*, la prolifération excessive des cellules due à la perte de *pitx2c* ne parviendrait pas à compenser la réduction du nombre de progéniteurs de la glande parapinéale induite par la perte de *tbx2b*.

III.2.3. *pitx2c* contribue à la migration de la parapinéale

Parallèlement à son action sur la prolifération des cellules de la parapinéale, la perte de *pitx2c* engendre un second phénotype flagrant : dans les embryons perte de fonction *pitx2c*, les cellules de parapinéale migrent de façon dispersée. Bien que la migration soit toujours dirigée vers la gauche et initiée dans une fenêtre de temps correcte dans l'absence de *pitx2c*, les cellules perdent leur cohésion (Figure 39) alors que dans les embryons sauvages les cellules de la parapinéale forment un groupe extrêmement cohésif qui ne perd jamais son organisation durant la migration. Dans les embryons où *pitx2c* est surexprimé à 16hpf ou 18hpf, la migration de la glande parapinéale est également affectée (Figure 40 A-D'). Dans une grande majorité des individus, la migration est bloquée à ses premiers stades, dans la partie antérieure gauche du complexe pinéal. Certains embryons présentent même des cellules

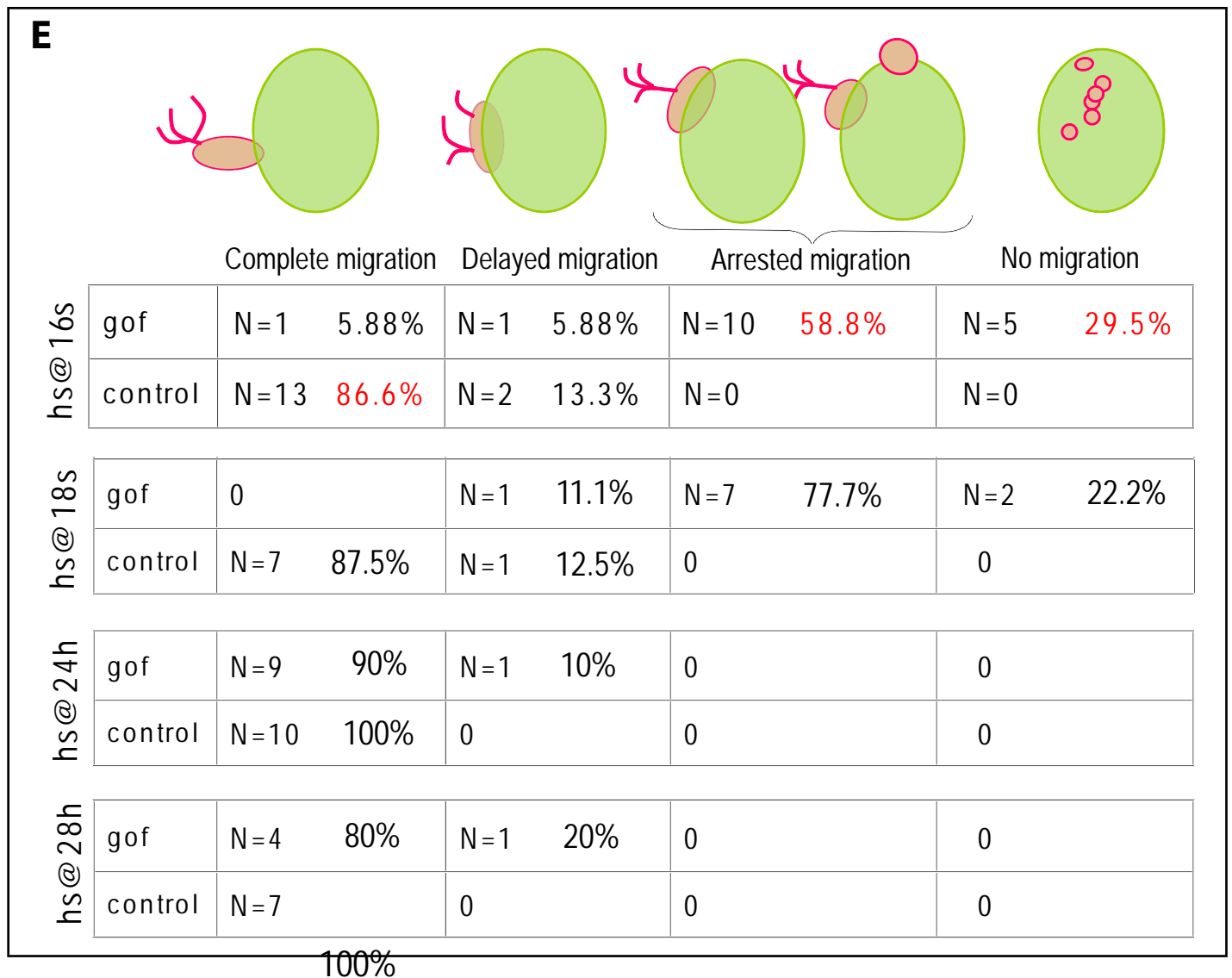
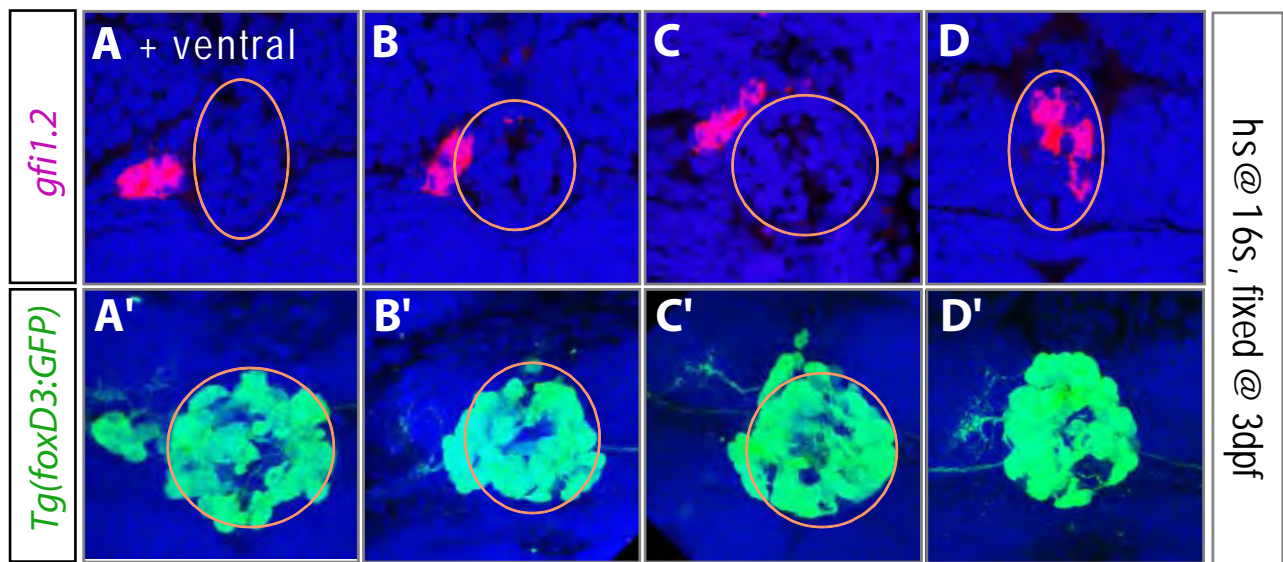
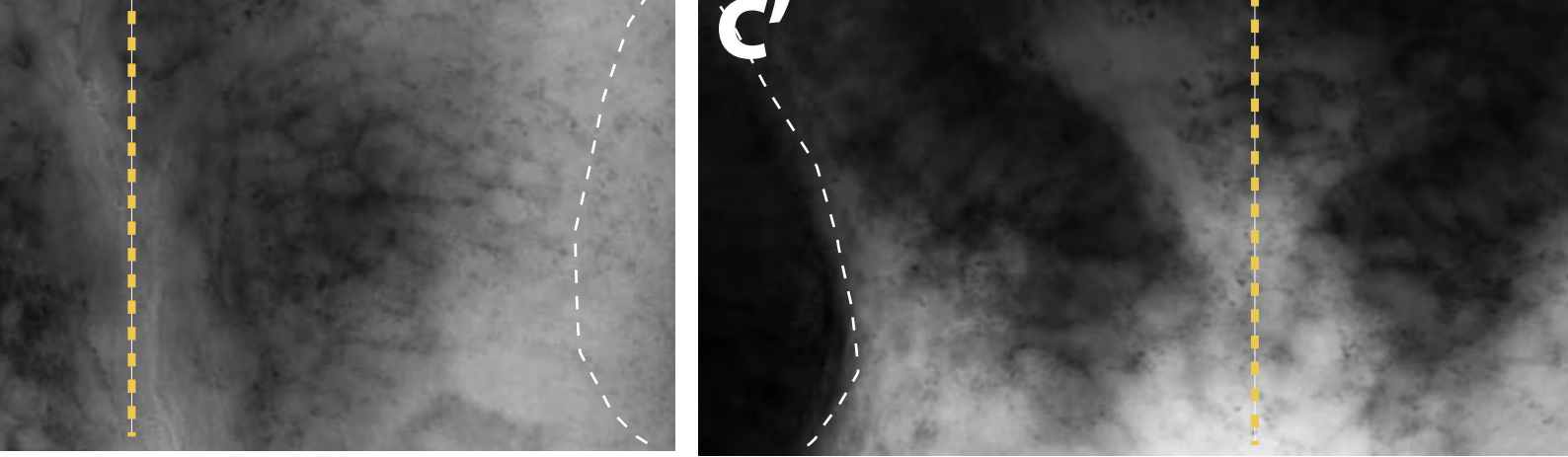


Figure 40 : Le gain de fonction de *pitx2c* interfère dans la migration de la glande paracardiale.

A-A') A 3dpf, la paracardiale a migré à gauche et se loge sous l'épiphyse ventralement.

B-D') Lorsque le gain de fonction *pitx2c* est induit par un choc thermique à 16hpf, la glande paracardiale présente des défauts de migration. La gamme des phénotypes s'étale d'une paracardiale non migrée dont les cellules se répartissent au sein de l'épiphyse (cerclée d'orange) à une paracardiale qui a migré mais qui présente un retard par rapport aux embryons sauvages (position plus dorsale).

E) Pourcentage d'embryons classés dans les 4 catégories selon le degré de migration de la glande paracardiale. Les chocs thermiques effectués après 24hpf n'entraînent plus de défauts dans la migration.



de *erm*, gène cible de la voie Fgf, sont effectués.

L'expression de *fgf8* en hybridation *in situ* révèle une expression forte et localisée de l'épithalamus à 24 et 28hpf.

Ces résultats, en accord avec ceux obtenus avec *pitx2c*, l'asymétrie d'expression est conservée.

Elle est étendue dans les territoires gauches et droitiers.

Fgf est exprimé plus fortement à gauche. Dans les mutants, l'expression est conservée.

Comparativement aux embryons sauvages, les mutants *fgf8* et *pitx2c* expriment

la ligne médiane, les lignes pointillées et les lignes médianes.

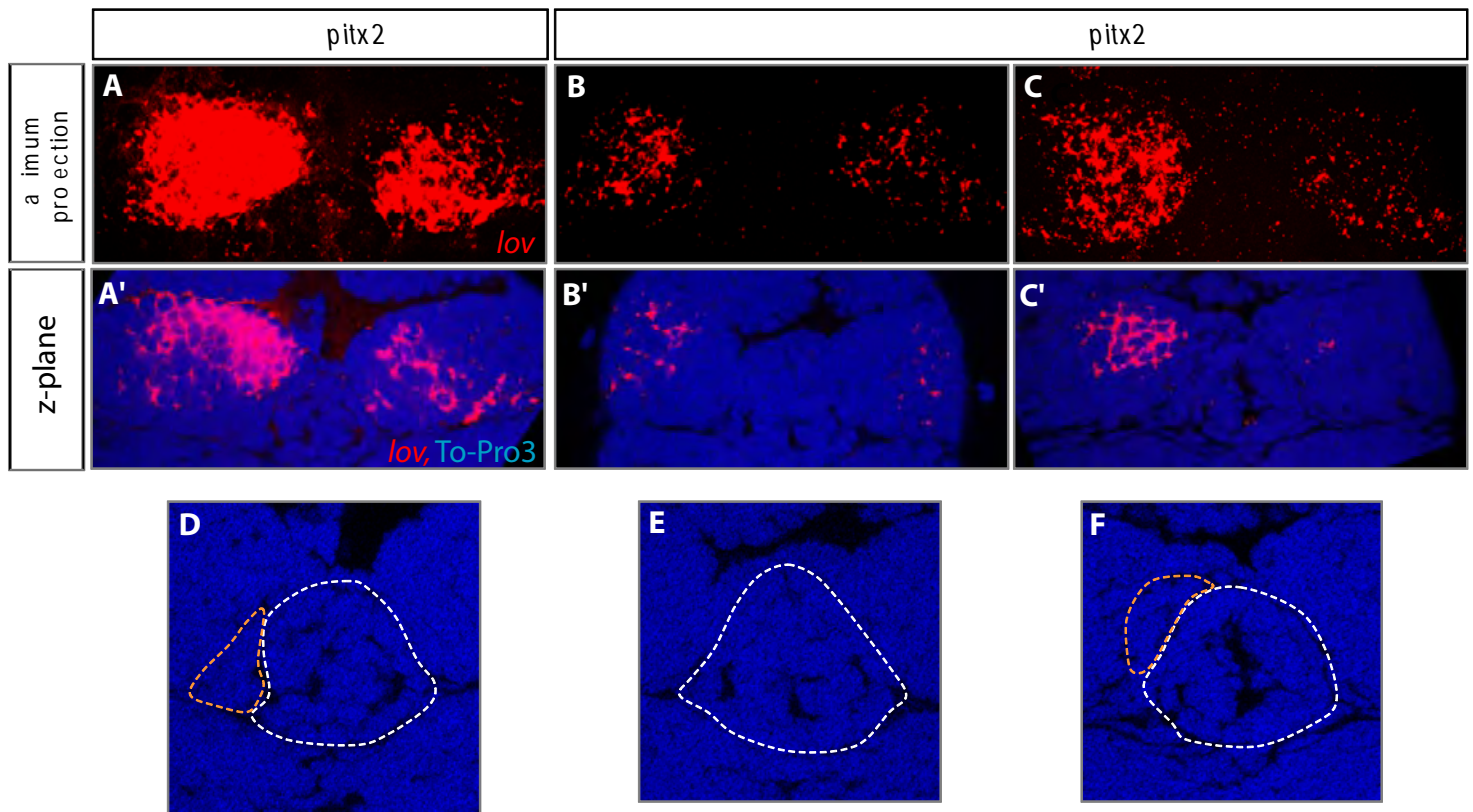


Figure 42 : Le gain de *pitx2c* entraîne des défauts dans l'acquisition des identités neurales habénulaires.

A-A') Dans les embryons contrôles *Tg(uas:pitx2c)*, l'expression de *lov* est asymétrique et plus étendue dans le noyau gauche de l'habenulae.

B-C') Dans les embryons gain de fonction doubles transgéniques *pitx2* soit l'expression de *lov* est symétrisée avec un profil double droit (B-B') soit l'expression reste asymétrique mais plus faible (C-C').

D-F) l'expression de *lov* peut être corrélée avec la position de la parapinéale repérée grâce au marquage nucléaire ToPro-3. Dans les embryons contrôles où l'expression de *lov* est asymétrique, la parapinéale (entourée par des pointillés orange) est facilement repérable à gauche de l'épiphyse (entourée en pointillés blancs) (D). Dans les embryons perte de fonction où l'expression de *lov* est symétrique de type double droit, elle s'accompagne d'une l'absence de glande parapinéale clairement définie (E). Dans les embryons où l'expression de *lov* est asymétrique mais faible, la parapinéale semble retardée dans sa migration et reste dans le cadran antérieur gauche du complexe pinéal (F).

parapinéales bloquées sur la ligne médiane au sein du complexe pinéal. Dans le but de savoir à quel moment *pitx2c* influe sur la migration, le gain de fonction a été réalisé à plusieurs stades. Alors que des gains de fonction réalisés à 16s et 18s bloquent tous deux la migration de la parapinéale, des gains de fonctions plus tardifs, à 24 et 28hpf, lorsque la migration s'amorce, n'ont pas d'effet sur la migration de la glande parapinéale qui semble normale (Figure 40 E).

Il semble donc que l'activité de *pitx2c* soit nécessaire entre 18 et 20hpf pour permettre une migration correcte de la glande parapinéale. La dose de *pitx2c* pourrait être liée à la localisation finale des cellules de la parapinéale qui ne migrent pas en cas de gain de fonction et trop loin et de façon désorganisée en cas de perte de fonction de *pitx2c*. Des cas semblables de défaut de migration sont connus dans les mutants *fgf8*, où la parapinéale reste bloquée sur la ligne médiane (Regan et al., 2009). L'expression de *fgf8* dans les morphants *pitx2c* semble renforcée tout en restant subtilement asymétrique à 28hpf (Figure 41). Hypothétiquement, *pitx2c* pourrait à travers son influence sur *fgf8* réguler la migration de la parapinéale sans intervenir dans la latéralité de la migration.

Dans le mutant *acerebellar*, où la glande parapinéale est correctement spécifiée mais où sa migration est abolie, les habenulae présentent un isomérisme droit. Cela suggère que la migration a un rôle dans l'acquisition des identités. La proximité de la glande parapinéale avec l'habenula gauche serait nécessaire à l'acquisition de l'identité gauche. Auquel cas, l'identité droite serait une identité par défaut. Comme la parapinéale présente des difficultés de migration dans le gain de fonction, nous avons vérifié l'expression de *kcd12.1/lov* dans les habenulae. Dans les embryons où les cellules de la parapinéale ne migrent pas, les habenulae montrent un isomérisme droit. Dans les embryons où la migration est partielle et où la parapinéale est dans la partie antérieure gauche à 3dpf, l'expression de *lov* est fortement diminuée bien qu'un renfort d'expression dans l'habenulae gauche persiste (Figure 42). De façon corrélative, ces expériences suggèrent que la migration de la parapinéale en partie contrôlée par *pitx2c* agirait sur l'asymétrie de l'expression des marqueurs habénulaires.

La migration correcte ainsi que le contrôle de la taille de la glande parapinéale, assurés par *pitx2c*, semblent être deux éléments clés de l'établissement des asymétries des noyaux habénulaires.

DISCUSSION

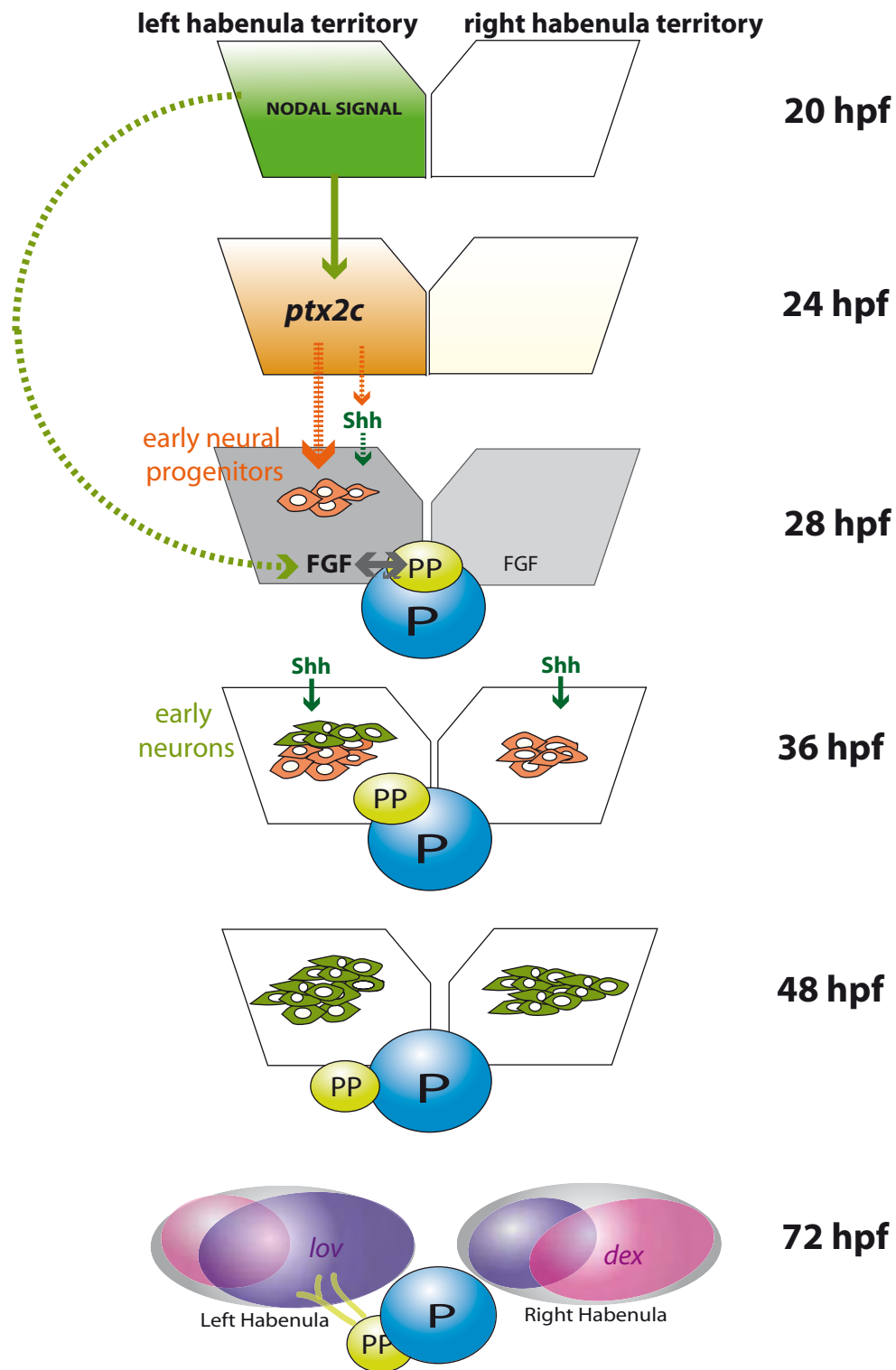


Figure 43 : Mise en place de la neurogenèse asymétrique des habenulae.

Sous l'action de la voie de signalisation Nodal dans le territoire gauche de l'épithalamus, *ptx2c* est exprimé à gauche. *ptx2c* induit l'apparition de neurones précocement dans l'habenulae gauche à 36hpf. L'action de *ptx2c* pourrait agir *via* une augmentation de l'activité de la voie Shh connue pour être nécessaire à la neurogenèse globale des habenulae. A 48hpf, les deux noyaux habénulaires sont formés de neurones matures. A 72hpf, les neurones ont acquis leurs identités (*kctd12.1/lov* ou *kctd8/dex*).

Parallèlement, et indépendamment de *ptx2c*, la voie Nodal impose la latéralité de la glande parapinéale. Le subtil renforcement de l'expression de *fgf8* dans le territoire gauche pourrait expliquer la latéralité gauche de la glande parapinéale puisque la voie de signalisation Fgf est nécessaire à la migration de cette structure.

I) PITX2C, FACTEUR DE TRANSCRIPTION RELAIS ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION NODAL ET L'ASYMETRIE DE NEUROGENESE DES HABENULAE

Les études précédentes avaient montré l'implication de la voie Nodal dans l'établissement de l'asymétrie de neurogenèse et dans le biais de la latéralité de l'asymétrie. Le mécanisme via lequel Nodal influe sur les asymétries de l'épithalamus restait alors inconnu. L'étude de *pitx2c*, gène cible de la voie de signalisation Nodal, fait avancer d'un cran notre compréhension de l'influence de cette voie de signalisation sur l'établissement des asymétries de l'épithalamus. Cependant, l'étude de ce gène cible soulève de nouvelles questions.

Pitx2c, relais de la voie Nodal pour imposer l'asymétrie de neurogenèse.

L'ensemble de mes résultats montrent que *pitx2c* est nécessaire de manière cellulaire autonome à la mise en place de l'asymétrie de neurogenèse. Une hypothèse parcimonieuse voudrait que l'asymétrie de neurogenèse soit suffisante pour biaiser la latéralité de la migration de la parapinéale. Cependant, les expériences de perte et de gain de fonction de *pitx2c* suggèrent que ces deux mécanismes sont découplés. La voie Fgf est connue pour être impliquée dans la migration de la parapinéale et l'expression de *fgf8* est subtilement asymétrique grâce à l'action de Nodal (Regan et al., 2009). Dans ce contexte, Nodal pourrait à la fois influencer sur la voie Fgf pour biaiser la migration de la parapinéale et parallèlement, via *pitx2c*, imposer l'asymétrie de neurogenèse (Figure 43). L'identification des cibles de la voie Nodal au sein de l'épithalamus est nécessaire pour connaître les acteurs impliqués dans le biais de la migration de la parapinéale. En parallèle de la recherche des gènes cibles de *pitx2c* par approche transcriptomique, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq dans le mutant *spw*^{-/-} dans lequel la voie Nodal est inactive dans l'épithalamus. Cette liste de cibles potentielles de la voie Nodal a été pré-validée par la dérégulation de gènes cible de Nodal connus comme Lefty. Une analyse par PCR quantitative permettra de confirmer que l'expression de ces gènes varie en l'absence d'activité de la voie Nodal dans l'épithalamus. L'analyse de la liste de gènes dérégulés dans ce contexte perte de fonction révélera les gènes

contrôlés par la voie de signalisation Nodal et potentiellement impliqués dans le contrôle de la latéralité de la glande parapyrinale.

Pitx2c, acteur de la balance prolifération/différenciation dans les habenulae.

La façon dont le facteur de transcription *pitx2c* impose l'asymétrie de neurogenèse reste inconnue. Via quelles cibles *pitx2c* régule-t-il les mécanismes de différenciation des cellules neurales, en favorisant la différenciation au détriment de la prolifération dans l'habenulae gauche? Pour expliquer comment la voie de signalisation Nodal et *pitx2c* imposent l'asymétrie de la différenciation des neurones HuC/D+ des habenulae, deux hypothèses peuvent être avancées : soit les progéniteurs neuraux quittent plus tôt le cycle cellulaire à gauche soit c'est le processus de différenciation qui est affecté une fois que les cellules ont quitté le cycle cellulaire dans l'habenula gauche. Pitx2c est connu pour être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire via son action sur les cyclines et notamment la cyclin D1. Des études réalisées *in cellulo* sur des myoblastes en culture (Martinez-Fernandez et al., 2006) montrent que la surexpression de *pitx2* garde les cellules dans un état prolifératif et prévient la différenciation terminale des cellules

in vivo chez le poulet (Ishimaru et al., 2008), le rôle de *pitx2c* est d'augmenter la prolifération. Les auteurs suggèrent que *pitx2c* pourrait réguler cyclinD1 directement en se liant à son promoteur et indirectement par l'inhibition du récepteur RALDH2 (acteur de la voie de signalisation acide rétinoïque). Par ailleurs, il a été montré en culture de myoblastes que la phosphorylation de *pitx2c* d'emmener les cellules vers la différenciation. C'est notamment le cas dans les myoblastes en culture où *pitx2c* par déstabilisation du transcrit *cyclin d1* permet de pousser les cellules dans un processus de différenciation (Gherzi et al., 2009). Force est de constater que *pitx2c* joue différents rôles dans la balance prolifération/différenciation selon les contextes. Dans notre système, le rôle de *pitx2c* permettrait de promouvoir la différenciation précoce. Des expériences de « birth-dating » dans des contextes où la voie de signalisation Nodal est absente ou dans des contextes de gain et de perte de fonction de *pitx2c* pourraient permettre de statuer quant à l'influence de Pitx2c sur la prolifération des précurseurs habénulaires. Des expériences d'incorporation de BrdU par pulse à différents stades entre 24hpf et 48hpf pourraient être réalisées (Aizawa et al., 2007). Seuls les noyaux réalisant leur dernière phase S lors du « pulse » BrdU seront marqués, permettant ainsi de les quantifier à ce stade donné dans chaque habenula. Si la voie Nodal *via pitx2c* avance le « timing » de la phase S des premiers neurones, les embryons perte ou gain de fonction

devraient montrer un nombre équivalent de cellules en phase S entre habenula gauche et droite à un stade donné. En revanche, si la voie Nodal et *pitx2c* ont une action seulement sur la différenciation, l'asymétrie décrite pour les phases S devrait perdurer.

La perte de *pitx2c* entraîne une symétrisation de l'apparition du marqueur *kcdt12.1/lov* à 36hpf ; le profil observé laisse suggérer un retard dans l'acquisition de ce marqueur à gauche, la symétrie étant plutôt de type isomérisme droit. Cette observation étaye l'hypothèse d'un délai de la neurogenèse dans le noyau gauche habénulaire aboutissant à la symétrisation de la neurogenèse dans la perte de fonction de *pitx2c*.

Le crible des gènes effecteurs *pitx2c* ouvre des pistes pour révéler les acteurs de la neurogenèse asymétrique.

Pour savoir quelles sont les cibles transcriptionnelles de *pitx2c* dans l'épithalamus, une approche non biaisée et globale permet d'entrevoir des pistes expliquant comment *pitx2c* influe sur le « timing » de neurogenèse. La réalisation d'un WTSS (Whole Transcriptome Shotgun Sequencing) au stade 22hpf n'a pas permis de révéler la dérégulation de gènes impliqués dans le processus de neurogenèse ou d'acteur du cycle cellulaire comme de la cyclinD1, connue pour son interaction avec *pitx2c*. Sachant que l'asymétrie des progéniteurs neuraux des habenulae n'est détectée qu'à partir de 28hpf, la régulation pourrait se faire indirectement. Auquel cas, le stade d'extraction des ARNm totaux (22hpf) ne permettrait pas d'observer la dérégulation plus tardive de la cycline. L'action de *pitx2c* sur la neurogenèse pourrait également s'exercer via d'autres gènes cibles. L'approche globale a permis de révéler d'autres gènes potentiellement impliqués dans le « timing » de neurogenèse. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux acteurs de la voie Shh. En effet, des résultats non publiés produits dans l'équipe ont permis de mettre en évidence l'influence de la voie Shh dans la neurogenèse globale des habenulae. La perte de fonction de la voie dans le mutant *smo*^{-/-} entraîne une absence totale de production de neurones dans les noyaux habénulaires (Halluin et al., en préparation). Aussi, l'hypothèse suivante peut être posée : un subtil gain d'activité de la voie Shh dans l'habenulae gauche sous le contrôle de *pitx2c* pourrait être la cause de l'asymétrie de neurogenèse. Parmi les gènes cibles très fortement régulés négativement dans la perte de fonction de *pitx2c* se trouve *ift80*, impliqué dans la formation des cils et décrit comme régulant l'activité de la voie Shh chez le poisson zèbre (Beales et al., 2007). Sa diminution dans la perte de *pitx2c* pourrait être responsable d'une baisse d'activité de la voie Shh dans l'habenulae gauche conduisant à la symétrisation de la neurogenèse. Gli,

acteur de la cascade de transduction de la voie Shh est également dérégulé dans les conditions de pertes de fonction de *pitx2c*.

Afin de confirmer que les gènes cibles sont effectivement dérégulés en l'absence de *pitx2c*, des PCR quantitatives devront être réalisées : le prélèvement des cellules du territoire habénulaire et la comparaison des gènes qui y sont exprimés dans des conditions sauvages ou perte de fonction *pitx2c* donneront les arguments nécessaires pour attester de la dérégulation de ces gènes.

Une fois la dérégulation de ces gènes avérée dans le contexte de perte de fonction de *pitx2c*, l'impact des candidats sur l'asymétrie de neurogenèse devra être testée. Une large palette d'outils est disponible chez le poisson zèbre pour tester l'hypothèse d'une interaction entre la voie Shh et *pitx2c*. Tout d'abord, une vérification du patron d'expression de ces gènes par hybridation *in situ* permettrait d'analyser leur profil d'expression et leur éventuelle asymétrie d'expression. Cependant, si une telle asymétrie existe, elle devrait être subtile car la voie Shh est requise pour la mise en place de la neurogenèse globale des habenulae. Contrairement au patron unilatéral de *pitx2c*, les patrons d'expression des gènes impliqués dans la signalisation Shh devraient être bilatéraux. Aussi, une comparaison de l'expression de ces gènes par des qPCR réalisées sur les territoires gauche ou droit des habenulae après leur dissection, ainsi que leur comparaison, permettrait de mettre en évidence des asymétries d'expression non repérables par hybridation *in situ*. La comparaison entre les contextes sauvages et perte de fonction *pitx2c* révélera si cette asymétrie est levée en l'absence de *pitx2c*. Pour tester l'action des gènes candidats sur la neurogenèse des habenulae, des approches par perte ou gain de fonction peuvent être envisagées. Dans la diminution de l'activité de Shh, on s'attend à ce que la neurogenèse précoce gauche soit abolie. La perte de fonction d'*ift80* par injection de morpholino ou la perte de fonction de *gli1* dans le mutant *detour* (*gli1^{te370a/te370a}*, (Vanderlaan et al., 2005)) permettrait de savoir si la perte de l'un ou de l'autre de ces facteurs symétrise la neurogenèse. Cependant, dans la mesure où la voie Shh est nécessaire à la neurogenèse des habenulae, le blocage d'un des facteurs essentiels à son activité pourrait bloquer toute la neurogenèse habénulaire. Dans ce cas, le gain de fonction conditionnel, comme nous l'avons fait pour *pitx2c*, permettrait de tester l'implication de ces gènes dans l'asymétrie de neurogenèse. En cas de gain de fonction de la voie Shh, on s'attendrait plutôt à un avancement de la neurogenèse dans l'habeulae droite. Pour vérifier cette hypothèse, des gains de fonction de ces gènes grâce à la lignée transgénique *Tg(hsp70l:gli1-EGFP)* (Shen et al.) et à la construction d'une lignée *Tg(hs: ift80)*, permettront de tester l'implication de ces facteurs dans l'asymétrie de neurogenèse des habenulae.

Une action directe de la voie de signalisation Nodal ?

Pitx2c agit de manière cellulaire autonome sur les neurones habénulaires qui apparaissent les premiers. Cependant, le nombre de cellules exprimant le transcrit *pitx2c* est plus important que le nombre de neurones précoces apparaissant à 36hpf dans l'habenulae gauche. Une restriction de l'action de *pitx2c* est donc nécessaire pour former un nombre correct de neurones précoces. Grâce à la diffusion du ligand Nodal, même si certaines cellules n'expriment pas Nodal, la voie Nodal y sera activée. On peut alors imaginer que les cellules qui produisent et reçoivent directement le signal Nodal et qui expriment par la suite *pitx2c* sont celles qui deviendront les neurones précoces. Afin de savoir si ce sont les cellules qui reçoivent directement le signal Nodal qui deviennent les neurones précoces, il serait intéressant de suivre l'activation de la voie Nodal et la corrélérer avec le devenir des cellules. La translocation de Smad2 dans le noyau pourrait être un bon rapporteur de l'activité de Nodal au sein des cellules. L'analyse en temps réel de cette translocation dans une lignée rapportrice de l'identité neurale, comme *Tg(Huc:GFP)*, permettrait de répondre à cette question. Par ailleurs, des expériences de transplantation de cellules incapables de recevoir le signal Nodal nous permettraient de dire si les cellules de l'épithalamus gauche exigent la réception directe de ce signal pour devenir les neurones qui apparaissent plus précocement dans l'épithalamus gauche. Nous avons montré au laboratoire que les cellules mutantes pour le cofacteur *oep* étaient incapables de s'intégrer dans les habenulae. L'utilisation de cette mutation ne permet pas de répondre à la question posée. Aussi, l'utilisation d'une version dominante négative du récepteur *alk* spécifique de Nodal pourrait permettre de surpasser ce problème.

Quel rôle pour l'asymétrie de neurogenèse ?

Même si les acteurs agissants sur la neurogenèse en aval de la voie Nodal sont mieux définis, l'intérêt d'imposer cette asymétrie n'est pas évident. Le fait que les projections

axonales des habenulae vers le noyau interpédonculaire soient désorganisées suggère des pistes de réflexion. Il est connu dans d'autres modèles que des neurones qui projettent leurs axones en premier permettent de définir un chemin d'accès jusqu'à la cible et que les neurones nés plus tardivement ne font que suivre ce chemin prédéfini. Si l'on transpose ce modèle classique à notre situation, les premiers neurones nés seraient les premiers à se projeter et ils définiraient la zone sur laquelle tous les autres neurones se projetteront. En effet, comme les neurones gauches et droits se projettent en majorité en dorsal du noyau interpédonculaire, les premiers neurones auraient plus un rôle dans la détermination de la cible des projections que dans la détermination du chemin d'accès jusqu'à cette cible. L'absence de neurones nés précocement à gauche conduirait alors à une désorganisation globale du noyau interpédonculaire par absence de cible prédéfinie pour les axones des neurones gauches ou droits.

Le marquage global des projections ne permet pas de déterminer si en l'absence de *pitx2c*, les axones se projettent plutôt en dorsal ou en ventral de l'IPN. Seule une analyse par électroporation focale qui marque un seul neurone, permettrait d'étudier la morphologie de la terminaison axonale (Bianco et al., 2008). En effet, la morphologie de l'axone est spécifique à la partie de l'IPN sur laquelle elle se projette. Ceci permettrait de savoir à quel type appartiennent les projections axonales des morphants. *Pitx2c* pourrait avoir des rôles autres que celui qu'il a sur la neurogenèse et agir directement sur la guidance axonale. Pour s'assurer que seule l'asymétrie de neurogenèse est touchée dans la perte de fonction de *pitx2c*, le phénotype engendré par l'augmentation de la taille de la parapinéale peut être supprimé par ablation de la moitié des progéniteurs parapinéaux. Par la suite, une analyse des projections axonales de façon globale, par immunomarquage ou marquage rétrograde, déterminerait si l'asymétrie de neurogenèse est nécessaire à la projection correcte des axones sur le noyau interpédonculaire. Alternativement, et pour éliminer toute manipulation génétique et confirmer que les premiers neurones sont nécessaires à la projection correcte des autres axones habénulaires, l'ablation des premiers neurones pourraient être réalisée. Dans une lignée *Tg(HuC:GFP)*, à 36hpf, seuls les neurones précoces gauches sont marqués et la destruction spécifique de ces cellules au laser bi-photon permettrait d'analyser par la suite si les projections axonales atteignent leur cible correctement.

Par ailleurs, un autre argument étaye l'hypothèse selon laquelle la neurogenèse asymétrique est nécessaire à la projection asymétrique des axones sur l'IPN. En effet, en cas d'ablation de la parapinéale, alors que la majorité des neurones *lov+* envoie leurs axones sur la partie ventrale de l'IPN, une petite proportion de neurones *lov+* projette tout de même sur la

partie dorsale (Bianco et al., 2008). En l'absence de glande parapyinéale, bien que les identités neurales soient isomériques de type droit, la neurogenèse reste asymétrique (Roussigne et al., 2009). Aussi, un lien se dessine entre les neurones qui apparaissent plus précocement dans le noyau gauche habénulaire et l'asymétrie des projections : les neurones précoces pourraient être ceux qui se projettent asymétriquement.

II) PITX2C, ACTEUR INSOUÇONNE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES DE LA PARAPINEALE & DE L'ACQUISITION DES IDENTITES DES NEURONES HABENULAIRES

Pitx2c régule la taille de la parapinéale.

De façon inattendue, nous avons pu montrer que *pitx2c* est également impliqué dans le contrôle de la taille de la parapinéale. Pitx2c étant un effecteur de la voie Nodal, et étant donné que la perte totale de Nodal n'entraîne pas de modification de la taille de la parapinéale, on attendrait que dans la perte de *pitx2c*, la taille de la parapinéale reste inchangée comparée aux individus sauvages. Cependant, la perte de *pitx2c* induit une prolifération excessive des cellules de la parapinéale alors que le gain de fonction ne modifie pas le nombre de cellules de la parapinéale. Pitx2c est donc nécessaire pour réprimer la prolifération des cellules de la glande parapinéale. Il existe donc un mécanisme qui induit la prolifération de ces cellules qui nécessite d'être réprimé. Alors que l'abrogation complète de l'activité de la voie Nodal par addition de doses massives de drogue SB431542 ne change pas la taille de la glande parapinéale, la diminution de l'activité de Nodal par addition de doses plus faibles aboutit à la diminution du nombre de cellules. Ces expériences suggèrent un modèle dans lequel Pitx2c contrecarrerait l'action de la voie Nodal. En effet, dans la diminution de l'activité de la voie Nodal, la perte de fonction *pitx2c* permet de rétablir un nombre correct de cellules dans la parapinéale. Nodal induit l'apparition excessive de cellules. Il existe donc une balance entre *pitx2c* et l'activité de la voie Nodal qui permettrait de maintenir un nombre moyen de cellules de la glande parapinéale. Dans la perte partielle de Nodal, le phénotype observé pourrait résulter soit d'une diminution de la prolifération soit de la diminution du nombre de cellules parapinéales spécifiées. La quantification du nombre de cellules spécifiées avant 28hpf, permettrait de trancher entre ces deux hypothèses. En parallèle, une analyse *in vivo* et en temps réel permettrait de savoir si la perte de *pitx2c* compense le nombre de cellules perdues dans la diminution de l'activité de la voie Nodal par une augmentation de la prolifération.

L'existence d'un facteur inconnu en aval de la voie Nodal qui contrôle la taille de la parapinéale est révélée indirectement. Pitx2c pourrait réguler ce facteur afin de contrebalancer l'effet pro-prolifératif. Aussi, la comparaison des listes de gènes issues du RNAseq dérégulés dans les conditions de perte de *pitx2c* et de perte de Nodal permettrait d'aiguiller les

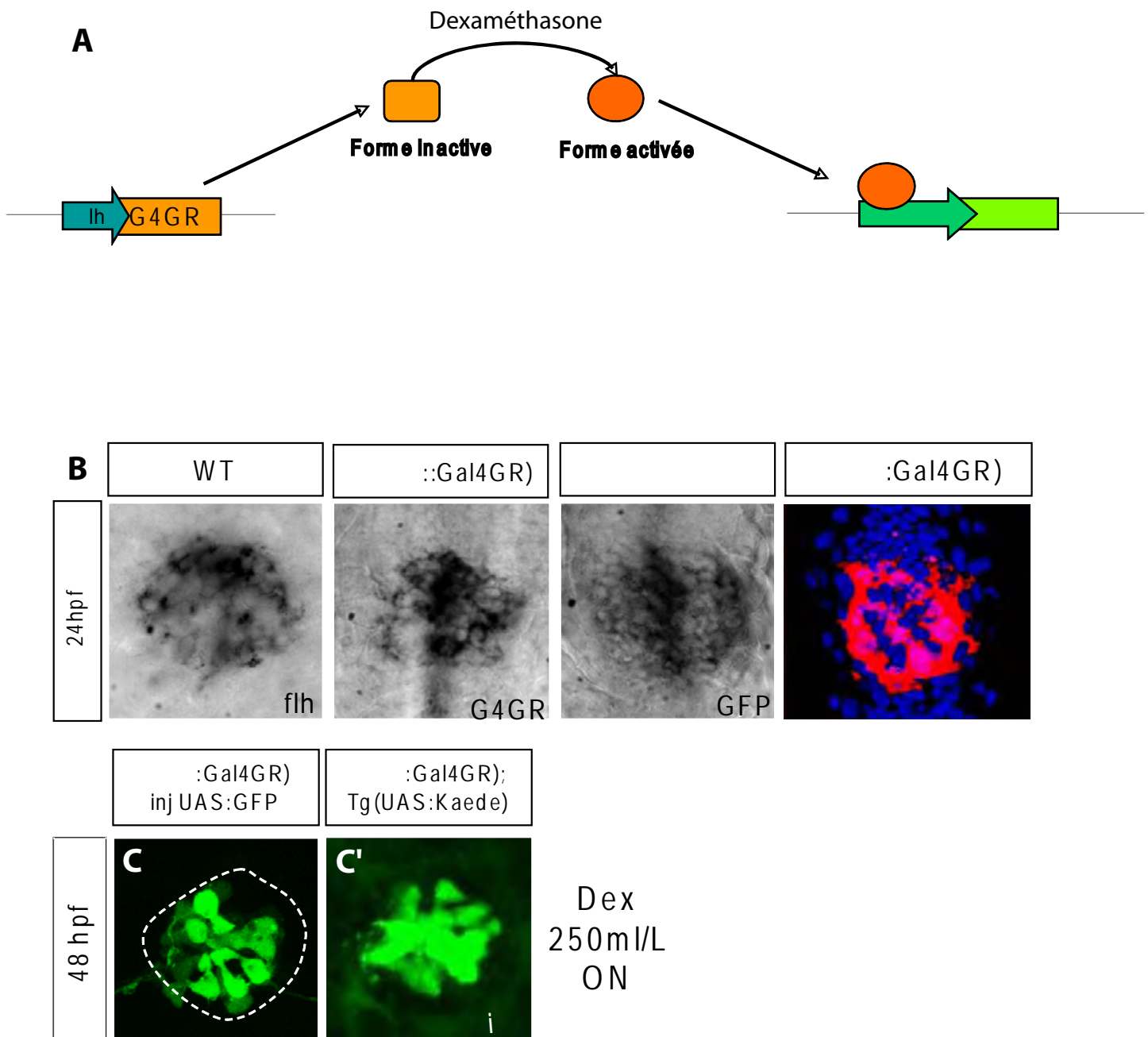


Figure 44 : Lignée inducible *Tg(Flh:G4GR)*

A) Principe de fonctionnement de la lignée *Tg(Flh:G4GR)* : Une version de gal4 fusionné au récepteur aux glucocorticoïdes a été clonée en aval du promoteur du gène *flh*. Dans un milieu sans dexaméthasone, Gal4 est sous sa forme inactive. Après ajout de dexaméthasone, Gal4, sous sa forme active, se fixe sur les répétition *uas* permettant l'expression des gènes clonés en aval.

B) Patron d'expression de *flh* endogène, de *g4gr* sous contrôle du promoteur de *flh*, et de la *gfp* également sous contrôle du promoteur de *flh*. Les hybridation *in situ* révélées en NBT/BCIP à 24hpf montrent que les patrons d'expression des ARNm sont identiques. La révélation en Fast-Red de l'hybridation *in situ* de *g4gr*, permet de voir que celui-ci est exprimé dans toutes les cellules du complexe pinéal à 24hpf.

C) Immunodétection de la GFP dans des individus *Tg(flh:G4GR)* injectée avec un plasmide *uas:gfp* au stade une cellules et traités de 24 à 48hpf avec la dexaméthasone. Malgré le mosaïcisme du à l'injection d'ADN, une grande partie des cellules expriment la GFP.

C') Dans des individus non fixés doubles transgéniques *Tg(flh:G4GR;uas:GFP)*, la GFP active dans toutes les cellules du complexe pinéal après un traitement sur la nuit à la dexaméthasone.

recherches sur un nombre réduit de facteurs. Dans le cas où *pitx2c* et le facteur en aval de la voie Nodal agiraient indépendamment l'un de l'autre, la recherche pourrait s'orienter vers des acteurs contrôlant indirectement la prolifération dans la liste de gènes dérégulés en l'absence *pitx2c* et vers des facteurs pro-prolifératifs dans le contexte de perte d'activité de la voie Nodal.

Malgré l'augmentation évidente de la taille de la parapinéale induite par la perte de *pitx2c*, il est surprenant que les cellules de la parapinéale n'expriment plus *pitx2c* au moment des divisions cellulaires surnuméraires, entre 28 et 32hpf. Cependant, plutôt dans le développement, entre 21 et 23hpf, les progéniteurs situés dans la partie antérieure gauche du complexe pinéal, expriment *pitx2c*. Il serait donc nécessaire que les cellules de la parapinéale expriment *pitx2c* pour éviter une prolifération excessive. Cependant, un effet non autonome ne peut pas être exclu : les cellules habénulaires adjacentes à la glande parapinéale, qui expriment *pitx2c* jusqu'à 3dpf, pourraient imposer une répression de manière non autonome sur les cellules de la parapinéale. Auquel cas, comme *pitx2c* est un facteur de transcription, le signal devrait être relayé. La délétion spécifique de *pitx2c* à des temps différents tout au long de son expression endogène pourrait permettre de savoir durant quelle période *pitx2c* est nécessaire à la prolifération des cellules parapinéales par utilisation de morpholinos photo-inductibles. Alternativement, une série de transplantation de cellules *pitx2c* morphantes permettrait de trancher quant à l'action autonome ou non-autonome de *pitx2c* dans la parapinéale. Si la taille des clones de cellules transplantées est plus grande lorsque les cellules transplantées sont morphantes que lorsqu'elles sont sauvages, alors l'action de *pitx2c* serait autonome cellulaire. En effet, les cellules transplantées ne possédant pas *pitx2c* effectueraient des divisions supplémentaires induisant une augmentation de la taille du clone au sein de la glande parapinéale. Une dernière possibilité pour déterminer le caractère autonome cellulaire de l'action de *pitx2c* serait un sauvetage localisé de l'expression de *pitx2c* dans un contexte morphant. L'ajout de l'hormone synthétique dexaméthasone dans le milieu, permet aux individus appartenant à la lignée inductible *Tg(flh :G4GR)* de rendre actif *gal4* selon le patron de *flh* et à un temps contrôlé (Figure 44). Croisée avec la lignée *Tg(uas :pitx2c)*, la lignée inductible permettrait de déclencher l'expression de *pitx2c* spécifiquement dans le complexe pinéal. Ce type d'expériences permettrait de savoir si c'est l'expression de *pitx2c* entre 22 et 24 hpf dans les progéniteurs parapinéaux qui est responsable de la production de cellules supplémentaires dans la glande parapinéale.

La taille de la glande parapinéale est un facteur déterminant l'asymétrie des domaines habénulaires.

Le second phénotype associé à la perte de *pitx2c* est une symétrisation partielle des marqueurs habénulaires : les deux habenulae adoptent une identité gauche vis-à-vis de l'expression de *lov*. Jusqu'à présent, l'isomérisme des marqueurs habénulaires adopté dans différents contextes génétiques était toujours complet. De façon inédite, dans la perte de *pitx2c*, ils varient indépendamment : alors que *lov* devient isomérique gauche, les patrons d'expression de *ron* et *dex* restent inchangés. Comme la taille des habenulae ne varie pas, le nombre de cellules à double identité *lov/ron* ou *lov/dex* doit augmenter dans ces individus. Il était jusqu'alors communément admis que l'identité de l'habenula droite (définie par l'expression restreinte de *kcdt12.1/lov* et large de *kctd8/dex*) était acquise par défaut de signal : le signal envoyé par la glande parapinéale permettait seulement d'induire l'identité gauche. Le fait que dans le contexte perte de fonction *pitx2c* les identités gauche et droite soient découplées suggère l'existence d'un signal inducteur de l'identité droite.

La symétrisation de *lov* apparaît comme un effet secondaire de la sur-prolifération des cellules de la glande parapinéale. Des études précédentes avaient déjà montré qu'il existe un nombre critique de cellules de la glande parapinéale en deçà duquel les sous-domaines habénulaires sont affectés : si les cellules parapinéales sont en trop faible nombre, les habenulae adoptent un isomérisme droit complet (Concha et al., 2003; Gamse et al., 2005; Snelson et al., 2008b). Inversement, lorsque que le nombre de cellule de la parapinéale augmente, les habenulae adoptent une double identité gauche. Nos expériences d'ablation laser dans un contexte de perte de *pitx2c* montrent qu'il existe un nombre maximal de cellules parapinéales au-delà duquel l'asymétrie du marqueur *lov* est affectée. Le maintien d'un nombre correct de cellules est donc essentiel à l'acquisition asymétrique des marqueurs habénulaires. Un seul autre contexte dans lequel le nombre de cellules parapinéales est augmenté est décrit jusqu'à présent : il s'agit du mutant *mib* (résultats non publiés, M. Roussigné). Aizawa et al., ont montré que la perte de la signalisation Notch dans le mutant *mib* entraînait un isomérisme gauche de *lov*. Des expériences d'ablation pour réduire le nombre de cellules de la parapinéale dans ce contexte permettraient de confirmer qu'une limite de la taille de la parapinéale doit être imposée afin que les marqueurs habénulaires soient asymétriques. Sans écarter une action autonome de Notch au sein des habenulae, la présence de cellules surnuméraires dans la parapinéale en association avec l'isomérisme gauche des habenulae conforte le modèle acquis dans le contexte de perte de *pitx2c*.

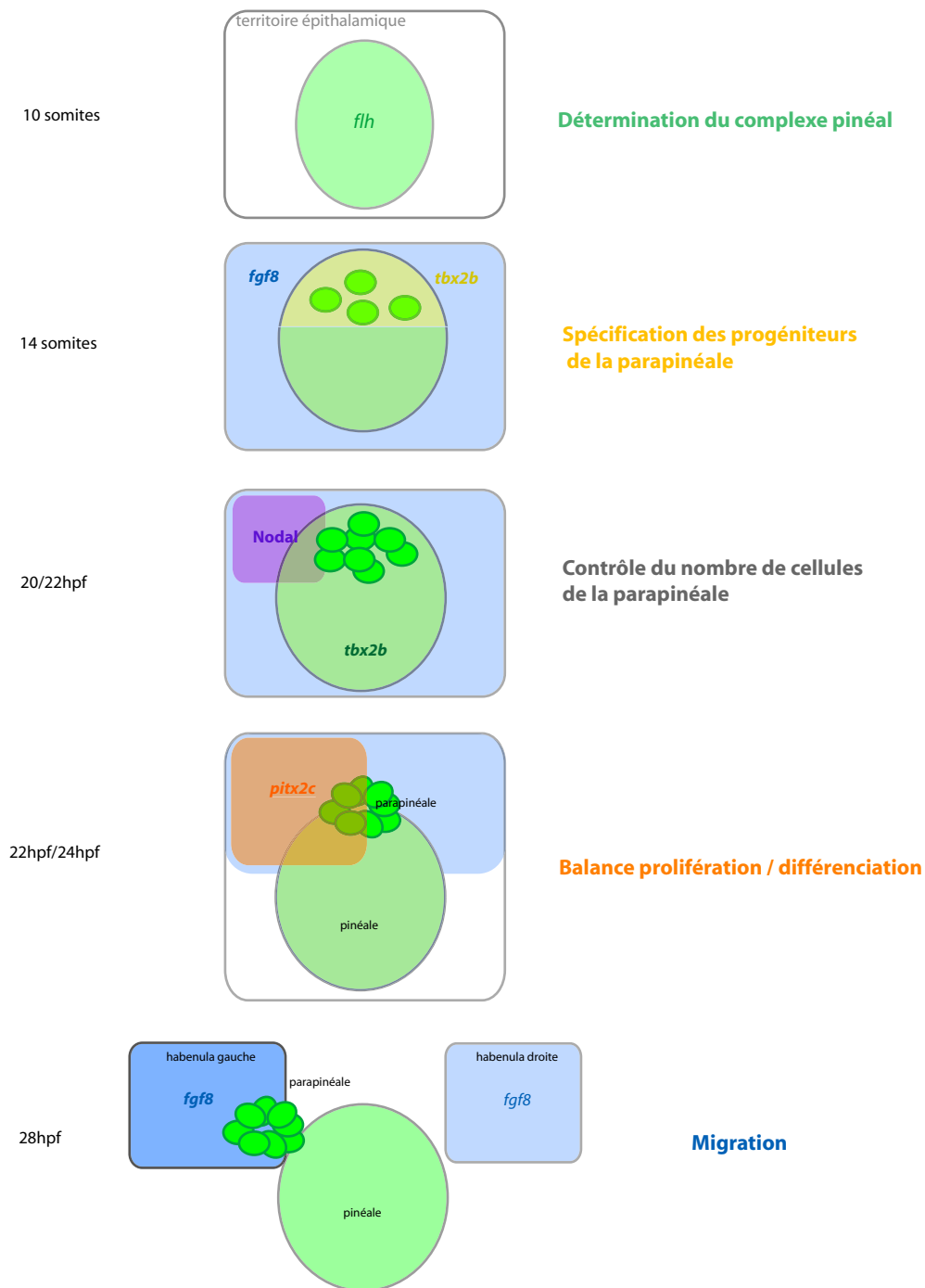


Figure 45 : Etapes de formation de la glande parapinéale.

Le complexe pinéal est défini au sein du territoire épithalamique grâce à l'action de *flh*.

la voie Fgf et le facteur de transcription *tbx2b* permettent de spécifier les progéniteurs de la glande parapinéale au sein du complexe pinéal.

L'action de la voie de signalisation Nodal permet de définir un nombre minimal de cellules de glande parapinéale. Pour définir la limite du nombre maximal de cellules de la glande parapinéale, *pitx2c* réprime la prolifération.

Enfin, le ligand *fgf8* exprimé dans les habenulae et le récepteur *fgfr4* exprimé par la parapinéale permettent la migration de cette dernière. La latéralité de la migration est quant à elle imposée par la voie de signalisation Nodal.

Les expériences d'imagerie en temps réel ont également pu mettre en évidence qu'en cas de perte de *pitx2c*, non seulement la prolifération augmente, mais elle intervient à un moment où il n'y a plus de division dans la parapinéale sauvage. Il y a en fait une poursuite voire une reprise des divisions cellulaires. Par ailleurs, nous avons pu observer un délai dans l'apparition des marqueurs de différenciation tels que *foxD3* d'environ 10h entre individus sauvages et morphants. La différenciation des cellules de la parapinéale est donc retardée. Malgré le fait que le signal envoyé de la parapinéale vers les habenulae soit toujours de nature inconnue, les cellules de la parapinéale pourraient signaler seulement dans leur état immature. L'excès de signal produit par les cellules pourrait également expliquer la perte d'asymétrie des marqueurs habénulaires : il permettrait à la parapinéale d'agir sur l'habenulae droite afin qu'elle acquière une identité gauche vis-à-vis de *lov*.

La taille de la parapinéale est donc un élément déterminant de l'asymétrie de l'épithalamus. Aussi, elle est finement régulée par plusieurs mécanismes. Il était connu que le facteur de transcription *tbx2b* est nécessaire pour obtenir un nombre correct de cellules de la parapinéale en contrôlant le destin des progéniteurs. Nos résultats montrent cependant qu'il n'existe pas de régulation génique entre *tbx2b* et *pitx2c* au niveau transcriptionnel. Le fait que les deux voies soient indépendantes souligne que la régulation du nombre de cellules dans la glande parapinéale est un point crucial qui doit être contrôlé de façon robuste et fine. Nous avons pu mettre en évidence que *tbx2b* est épistatique sur *pitx2c*. Il est donc possible que *tbx2b* définisse un nombre initial de cellules et que *pitx2c* bloque ensuite leur prolifération. La perte de fonction de *tbx2b* et la diminution de l'activité de la voie Nodal ayant le même phénotype de réduction du nombre de cellules de la parapinéale, *tbx2b* pourrait interagir avec la voie Nodal. L'analyse du patron d'expression de *tbx2b* en absence d'activité de la voie Nodal et du phénotype de la parapinéale dans la double perte de fonction, pourrait permettre de répondre à cette interrogation.

Un modèle de travail retraçant les étapes de la formation de la glande parapinéale peut être bâti sur la littérature actuelle et les résultats ici obtenus (Figure 45). La première étape est la détermination des cellules du complexe pinéal au sein du territoire épithalamique grâce à l'action de *flh*. En effet, en l'absence de *flh*, le complexe pinéal est quasiment totalement absent (Masai et al., 1997). Ensuite, les cellules de la glande parapinéale vont être spécifiées sous l'action de la voie Fgf. En l'absence de *fgf8*, les progéniteurs du complexe pinéal deviennent par défaut des photorécepteurs de la glande pinéale (Clanton et al., 2012). D'autre

part, le facteur de transcription *tbx2b*, exprimé précocement dans la partie antérieure du complexe pinéal, permet également la spécification. En absence de *tbx2b* dans le mutant *from beyond*, le nombre de cellules de la parapinéale est très réduit (Snelson et al., 2008b). Après cette étape de spécification, la parapinéale atteint, sous l'action de la voie Nodal, un nombre minimal de cellules qui permet d'assurer sa fonction inductrice des identités habénulaires. En cas de diminution de l'activité de la voie Nodal, les cellules sont présentes mais en nombre réduit. Lors de cette étape, la voie Notch/Delta pourrait également intervenir à la fois sur les progéniteurs pinéaux et parapinéaux puisqu'en cas de perte de l'activité de cette voie, pinéale et parapinéale ont un nombre de cellules anormalement élevé ((Cau et al., 2008), Roussigné, résultats non publiés). La prolifération des progéniteurs doit être régulée pour ne pas dépasser un nombre de cellules de la parapinéale maximal final. Aussi, la quatrième étape consiste en un contrôle de la prolifération par *pitx2c* qui établit ainsi une balance avec l'action de l'effecteur inconnu de la voie Nodal. Enfin, la taille de la parapinéale établie, celle-ci poursuit sa migration orchestrée par l'action de la voie FGF qui promeut le mouvement et de la voie Nodal qui impose la latéralité (Regan et al., 2009). Les étapes de détermination, de spécification et de prolifération permettent un contrôle précis de la taille finale de la parapinéale.

La migration de la glande parapinéale est un événement essentiel à l'acquisition des identités habénulaires.

Indépendamment de la taille de la parapinéale, la migration est un événement qui conditionne également l'identité des habenulae. Dans le gain de fonction de *pitx2c* alors que la taille de la parapinéale est sauvage, la migration est affectée. Dans ce contexte, la parapinéale ne s'éloigne pas de la ligne médiane et les habenulae présentent un isomérisme droit de *lov*. Alors que dans le mutant *ace*, la taille globale des noyaux des habenulae est drastiquement réduite, dans le gain de fonction de *pitx2c* la taille globale des habenulae est inchangée. Ces expériences de gain de *pitx2c* permettent de corréler l'événement de migration à l'acquisition des identités. Dans ce cadre, la migration de la parapinéale serait nécessaire pour diffuser un signal vers l'habenulae gauche en quantité suffisante pour que celle-ci acquière une identité gauche.

La perte de *pitx2c* cause également une absence de cohésion des cellules de la parapinéale ainsi qu'un défaut de sa localisation finale. Cet aspect du phénotype pourrait être

une conséquence de l'augmentation du nombre de cellules de la parapinéale ; en effet, dans les individus sauvages, la glande parapinéale doit se faufiler entre les vaisseaux sanguins et les cellules avoisinantes qui entourent le complexe pinéal pour migrer vers les habenulae puis se loger sous la glande pinéale. Le nombre accru de cellules pourrait contraindre la glande parapinéale à se positionner dorsalement. Alternativement, le manque de cohésion pourrait être causé par la perte de *pitx2c* et l'absence de migration dans les gains de *pitx2c* pourraient être liés à la régulation que *pitx2c* exercerait sur un acteur de la migration comme la voie Fgf. Dernière hypothèse alternative, la prolifération anormale qui se produit au cours de la migration empêcherait la parapinéale de conserver une organisation cohérente. Les remaniements apico-basaux et les phénomènes de divisions se déroulant de manière contemporaine de la migration pourraient être la cause de la désorganisation finale de la glande parapinéale. Une analyse des marqueurs de polarité cellulaire, des composants des jonctions cellulaires et de la dynamique des cellules au sein de la glande parapinéale en migration ouvrirait des pistes de réflexion pour expliquer ce phénotype.

CONCLUSION

La mise en place des asymétries neurales est un processus complexe mais est essentielle au fonctionnement correct du système nerveux. La clé de voûte des systèmes asymétriques étudiés jusqu'à maintenant est la voie de signalisation Nodal. Déjà essentielle à l'asymétrie viscérale à partir des stades les plus précoces, elle apparaît aujourd'hui, grâce au travail effectué chez le poisson zèbre, comme un élément clé de l'asymétrie et de la latéralité neurale. Il est étonnant de voir qu'à travers les modèles, la voie Nodal jalonne tout le parcours qui mène aux asymétries. Chez les organismes vertébrés, en passant par son action transitoire chez l'oursin, c'est toujours la voie Nodal qui initie la mise en place des asymétries précoces ou tardives, viscérales ou neurales. Ces gènes cibles dont notamment *pitx2* ont également des fonctions conservées chez les différents organismes, l'isoforme *2c* étant particulièrement impliquée dans la mise en place des asymétries.

Il est difficile d'imaginer que la complexité des mécanismes qui met en place les asymétries neurales chez le poisson zèbre ne soient pas liées à une ou des fonctions latéralisées. Même si certaines asymétries sont subtiles, comme celle de la neurogenèse habénulaire, et ne sont pas encore liées à des fonctions particulières, le développement de nouvelles techniques comme l'optogénique permettront sans doute de palier ce manque. Le contrôle de l'activité des neurones au niveau d'une cellule permet de manipuler finement les circuits neuronaux et d'étudier ensuite les comportements possiblement modifiés. En parallèle de ces approches fonctionnelles, les cribles non biaisés au niveau transcriptomique offrent des possibilités de découvrir les aspects moléculaires qui restent encore inconnus : le ou les signaux envoyés par la parapinéale, les acteurs en amont de *pitx2c*, en amont de la voie Nodal ou Fgf, les interactions entre voies de signalisation sont autant de domaines qui restent inexplorés.

MATERIEL ET METHODES

Conditions d'élevage des lignées et des embryons de poisson zèbre :

Les lignées sauvages ou transgéniques ont été élevées au Centre de Biologie du Développement à Toulouse selon les conditions optimales décrites dans la littérature (Kimmel et al., 1995) : entre 26,5 et 28,5°C et selon un cycle 14h de lumière /10h d'obscurité. Les embryons sont incubés à une température de 28,5°C ou retardés dans leur développement en abaissant la température à 18°C, puis fixés au stade d'intérêt, déterminé selon Kimmel et al., 1995, dans du BT-fix (paraformaldéhyde 4%, sucrose 4%, CaCl₂ 0.12mM, Na₂HPO₄ 75mM et NaH₂PO₄ 25mM). Ils ont été ensuite déshydratés dans des bains successifs de concentrations croissantes d'éthanol (25%, 50% puis 75%) et stockés dans de l'éthanol 100% à -20°C.

Etablissement des lignées transgéniques :

Les constructions plasmidiques sont injectées dans des œufs issus de lignées sauvages (AB*/Tü) au stade 1 cellule avec des ARNm codants la transposase qui permet l'insertion du plasmide dans le génome de l'embryon. Les embryons ayant intégré le transgène sont sélectionnés par la fluorescence verte du cœur induite par l'expression d'une protéine GFP produite sous le contrôle du promoteur *cmlc2*.

Hybridation *in situ* :

Les sondes utilisées sont produites suite à une digestion de 10µg du plasmide portant l'ADNc suivie d'une transcription *in vitro* réalisée par la polymérase T7 ou T3 en présence de rNTP marqués à la digoxygénine (*Promega*). Les hybridations *in situ* sont réalisées suivant le protocole décrit dans Oxtoby and Jowett (Oxtoby and Jowett, 1993).

<i>Sonde</i>	<i>Provenance</i>
<i>lov</i>	Gamse et al., 2003 et 2005
<i>ron</i>	Gamse et al., 2003 et 2005
<i>dex</i>	Gamse et al., 2003 et 2005
<i>brn3</i>	Aizawa et al., 2005
<i>gfi1.2</i>	Dufourcq et al., 2004
<i>pitx2</i>	Essner et al., 2000
<i>lefty-1</i>	Thisse and Thisse, 1999
<i>spw</i>	Long et al., 2003

Immufluorescence :

Les embryons, ayant été préalablement fixés et déshydratés, sont réhydratés puis perméabilisés par la protéinase K selon un temps adapté au stade embryonnaire. Après des lavages au PBS-TW (PBS 1X, Tween 0.1%), les embryons sont incubés à température ambiante dans du tampon de blocage (PBS 1X, Tween-20 0.1%, BSA 0.2%, DMSO 1%). Durant toute une nuit les embryons sont incubés à 4°C dans de l'anticorps primaire anti-GFP de lapin utilisé au 1/1000^{ème} (*Torrey Pines Biolabs*). Le lendemain, plusieurs lavages sont effectués au PBS-TW et les embryons sont à nouveau incubés dans du tampon de blocage durant 1h. Enfin, les embryons sont incubés pendant la nuit à 4°C avec un anticorps secondaire Goat anti-rabbit couplé au fluorochrome alexa-488 dilué au 1/1000^{ème} (*Molecular probes*). Le troisième jour, les embryons sont montés entre lame et lamelle dans du PBS-70% Glycérol pour être observés au microscope confocal (*Leica*).

Injections de morpholino et d'ARN messagers :

Les morpholinos ont été synthétisés par Gene Tools et ont été conçus pour cibler le site ATG ou le site d'épissage compris entre le 2^{ème} intron et le 3^{ème} exon pour cibler uniquement l'isoforme 2c de *pitx2*. Un morpholino contrôle a été également conçu en ajoutant des nucléotides mismatch dans la séquence du morpholino actif contre le ATG de *pitx2c*. Les morpholinos ont été réhydratés dans de l'eau ultrapure à la concentration de 3mM. Cette solution mère a été diluée à 1.5mM dans de l'eau et du rouge phénol pour être ensuite injectée dans les embryons de poisson zèbre au stade 1 cellule. Les embryons ont ensuite été fixés au stade désiré puis traités par hybridation *in situ* ou immunomarquage.

Pour les expériences d'imagerie en temps réel, les embryons ont été injectés au stade une cellule avec de l'ARNm H2B:RFP pour marquer les noyaux des cellules. Les embryons pertes de fonction pour *pitx2c* ont également été injectés avec du morpholino ATG. Les ARNm sens sont produits grâce au kit Machine mMessage (Ambion) selon les recommandations du fournisseur.

Imagerie :

Pour l'imagerie des embryons fixés, les embryons traités par hybridation *in situ* ont été montés dans du glycérol et analysés sur le microscope Zeiss Axiophot équipé d'une caméra digitale Nikon. Pour les marquages fluorescents, les embryons ont été montés en glycérol et l'épithalamus a été imagé en dorsal avec un microscope confocal Leica SP5 avec un objectif 63X à immersion huile.

Pour les films, les embryons vivants ont été inclus dans de l'agarose « low melting point » 0.8% et les acquisitions en temps réel ont été réalisées sur le microscope Zeiss Axio Observer LSM 710 pendant 15 à 17 heures avec une acquisition toutes les 15 minutes. Par la suite, les embryons ont été retirés de l'agarose pour poursuivre leur développement jusqu'à 3dpf, puis fixés et traités par immunomarquage.

Quantification des cellules de la parapinéale et suivi des divisions :

Pour détecter les cellules de la parapinéale, nous avons utilisé soit une hybridation *in situ* contre *gfi1.2* révélée en fluorescence ou un immunomarquage anti-GFP dans la lignée *Et(krt4:EGFP)^{sget11}*. Dans les deux cas, les noyaux ont été marqués grâce à une incubation dans le ToPro-3. Les cellules ont été quantifiées en utilisant le logiciel imageJ après acquisition d'images tous les 1µM sur un microscope confocal LeicaSP5.

Pour suivre les divisions des cellules de la parapinéale en cours de migration, les cellules ont été suivies manuellement sur Image J.

Transplantation de cellules :

Les embryons donneurs ont été injectés au stade une cellule avec de l'alexa568-dextran seul ou combiné avec du morpholino Mo1Pitx2c (1.5mM). Au stade dôme (4hpf), les embryons donneurs et hôtes ont été placés dans des puits d'agarose immergés dans une solution de méthylcellulose à 0.5%. En utilisant une pipette à aspiration, une vingtaine de cellules des donneurs a été insérée dans les embryons hôtes. Puis les embryons ont été placés dans des plaques 24 puits et cultivés dans de l'eau filtrée contenant de la pénicilline et de la streptomycine jusqu'à 36hpf ou 48hpf.

Quantification des neurones :

Après injection de morpholino au stade une cellule, les embryons se sont développés à 28,5° puis ont été fixés entre 34 et 36hpf. Après un marquage immunofluorescent avec l'anticorps anti-HuC/D, les embryons ont été imagés au microscope confocal puis les neurones ont été quantifiés manuellement sur le logiciel Image J. Le nombre de neurones contenu dans l'habenulae gauche ou droite ainsi que les index d'asymétries ($AI = [\text{nombre de neurones dans l'habenula gauche} - \text{nombre de neurone dans l'habenula droite}] / \text{nombre de neurones total}$) ont ensuite été reportés sur le logiciel Prism 5 software (GraphPad Software) grâce auquel les AI ont été comparés avec un t-test.

Pour les expériences de transplantations, après fixation des embryons receveurs à 36hpf ou 48hpf, des immunomarquages anti-HuC/D et anti-alexa568-dextran ont été réalisés. Les neurones ont été quantifiés manuellement sur le logiciel Image J. Les pourcentages de neurones HuC⁺ sauvages ou *pitx2c* morphant transplantés dans les habenulae ont été comparés avec un test de χ^2 sur le logiciel Prism 5 software (GraphPad Software). Le nombre de cellules transplantées dans les différentes conditions a été comparé avec un t-test.

Ablation de la parapinéale et traitement au SB431542 :

Les ablations des précurseurs de la glande parapinéale ont été réalisées dans la lignée transgénique *TgBAC(flh:flh-Kaede)^{vu376}* en utilisant un microscope confocal multiphoton Leica SP5. Les embryons se sont ensuite développés jusqu'à 3dpf, fixés et marqués par hybridation *in situ* pour quantifier le nombre de cellules de la parapinéale et l'asymétrie des habenulae. La voie de signalisation Nodal a été modulée en traitant les embryons avec l'inhibiteur spécifique SB431542 à partir de 16hpf.

Analyse volumétrique :

Pour quantifier les volumes basés sur l'expression de *kcd12.1*, *kctd8* ou *brain3*, des hybridations *in situ* révélées avec le fast-red (Sigma) ont été réalisées. Les images confocales ont été acquises tout les 0.18µm et les volumes ont été reconstruits sur le logiciel d'analyse d'image Volocity 3D. Pour déterminer l'AI de chaque individu, le volume du domaine d'expression à gauche moins le volume d'expression à droite a été divisé par la somme des deux volumes ($AI = [Vol\ G - Vol\ D] / Vol\ total$). Afin de comparer les moyennes, des t-tests ont été réalisés avec le logiciel Prism 5 software (GraphPad Software).

ANNEXES

Partially redundant proneural function reveals the importance of timing during zebrafish olfactory neurogenesis

Romain Madelaine^{1,2}, Laurence Garric^{1,2} and Patrick Blader^{1,2,*}

SUMMARY

Little is known about proneural gene function during olfactory neurogenesis in zebrafish. Here, we show that the zebrafish *Atonal* genes *neurogenin1* (*neurog1*) and *neurod4* are redundantly required for development of both early-born olfactory neurons (EONs) and later-born olfactory sensory neurons (OSNs). We show that *neurod4* expression is initially absent in *neurog1* mutant embryos but recovers and is sufficient for the delayed development of OSN. By contrast, EON numbers are significantly reduced in *neurog1* mutant embryos despite the recovery of *neurod4* expression. Our results suggest that a shortened time window for EON development causes this reduction; the last S-phase of EON is delayed in *neurog1* mutant embryos but mutant EONs are all post-mitotic at the same stage as EONs in wild-type embryos. Finally, we show that expression of certain genes, such as *robo2*, is never detected in *neurog1* mutant EONs. Failure of *robo2* expression to recover correlates with defects in the fasciculation of *neurog1* mutant olfactory axonal projections and in the organisation of proto-glomeruli because projections arrive at the olfactory bulb that are reminiscent of those in *robo2* mutant embryos. We conclude that the duration of proneural expression in EON progenitors is crucial for correct development of the zebrafish olfactory system.

KEY WORDS: Zebrafish, Olfactory neurogenesis, Proneural gene, *neurog1*; *neurod4*, Developmental timing

INTRODUCTION

The nervous system is established via a tightly controlled series of events, known as neurogenesis, which assures that the appropriate subtypes of neurons are born in the correct places and numbers, and at the correct times during embryogenesis. Many of the molecular mechanisms that regulate neurogenesis have been unravelled in the fruit fly (Gomez-Skarmeta et al., 2003). A key step during the initial phase of this process is the establishment of so-called proneural clusters in the *Drosophila* neuroectoderm, which are characterised by expression of proneural genes that belong to the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcriptional activators (Dambly-Chaudière and Vervoort, 1998). The conservation of genes homologous to *Drosophila* proneural genes, such as members of the neurogenin (*neurog*) and achaete-scute like (*ascl*) families, indicates that similar mechanisms are also at work in vertebrates (Bertrand et al., 2002).

The olfactory system has proven to be an attractive model for studying the role of proneural genes during vertebrate neurogenesis. In the mouse embryo, olfactory sensory neurons (OSN) are born in the sensory epithelium, which is itself derived from a pair of epidermal thickenings, or placodes, located on either side of the anterior neural plate (Cuschieri and Bannister, 1975a; Cuschieri and Bannister, 1975b; Smart, 1971). Loss-of-function studies in mice have shown that the sequential activity of members of the *Ascl* and *Neurog* families of proneural genes are required for the majority of OSN that develop. Indeed, the current model

suggests that progenitor cells expressing *Ascl1* gives rise to intermediate precursors that require *Neurog1* for differentiation (Cau et al., 2002; Cau et al., 1997; Guillemot et al., 1993; Nicolay et al., 2006). More recently, it has been shown that the winged-helix transcription factor *Foxg1* acts upstream of *Ascl1* for correct olfactory neurogenesis (Duggan et al., 2008). Similarly, microRNAs of the miR-200 family have been implicated in the maintenance of olfactory neurogenesis (Choi et al., 2008).

As in the mouse, olfactory neurogenesis in the zebrafish embryo occurs in placodes flanking the anterior neural plate. It has been shown that olfactory placodes themselves fate-map to a horseshoe-shaped population of cells at the boundary between the anterior neural plate and the adjacent non-neural ectoderm (Whitlock and Westerfield, 2000). Although this region gives rise to both the olfactory placodes and the telencephalon, progenitors of olfactory neurons are generally located more laterally and telencephalic progenitors more medially (Whitlock and Westerfield, 2000). Progenitors of olfactory neurons coalesce to form the olfactory placodes in a process that requires the chemokine receptor *Cxcr4b* and its ligand *Cxcl12a* (previously known as *Sdf1a*) (Miyasaka et al., 2007). Subsequently, neurons are born in two waves with the development of a population of so-called pioneer neurons preceding the birth of mature OSNs (Whitlock and Westerfield, 1998). Pioneer neurons are required for the correct projection of OSN axons to the olfactory bulb and undergo apoptosis once the first OSN axons have correctly reached their targets (Whitlock and Westerfield, 1998). As for correct placode formation at earlier stages, the *Cxcl12a*-*Cxcr4b* interaction is required for the proper guidance of pioneer axons (Miyasaka et al., 2007; Yoshihara, 2009); the *Robo2* receptor and *Slit* ligands have also been implicated in fasciculation and guidance of axons of olfactory neurons (Miyasaka et al., 2005; Yoshihara, 2009). Surprisingly, however, although a requirement for *Foxg1* and microRNAs has apparently been conserved between zebrafish and mouse during the early steps of olfactory neurogenesis, nothing is

¹Université de Toulouse, UPS, Centre de Biologie du Développement (CBD), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France. ²CNRS, CBD UMR 5547, F-31062 Toulouse, France.

*Author for correspondence (blader@cict.fr)

known concerning proneural gene function during the development of either early or late-born olfactory neurons in zebrafish (Choi et al., 2008; Duggan et al., 2008).

Here, we describe the role of *neurogenin1* (*neurog1*) and a second proneural gene of the Atonal family, *neurod4*, during olfactory neurogenesis in the zebrafish embryo. Our results indicate that these genes have overlapping functions during the development of early-born olfactory neurons and later olfactory sensory neurons. We also show that although the initial phase of *neurod4* expression requires Neurog1, *neurod4* expression recovers in the *neurog1* mutant; the late recovery of *neurod4* expression is sufficient for a reduced number of early-born neurons to develop. Finally, we show that there is a significant delay in the formation of mature OSNs in *neurog1* mutants despite the recovery of Neurod4 activity. Taken together, these results show that zebrafish uses a strategy for olfactory neurogenesis that is distinct from that used in the mouse.

MATERIALS AND METHODS

Fish lines and developmental conditions

Embryos were raised and staged according to standard protocols (Kimmel et al., 1995). Embryos homozygous for the *neurog1*^{hi1059} mutation (Golling et al., 2002) were obtained by intercrossing heterozygous carriers; adults heterozygous for the *neurog1*^{hi1059} allele were identified by PCR genotyping of tail-clip genomic DNA. The previously described *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgenic line was used to visualise early-born olfactory neurons (Blader et al., 2003). Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS, after which they were dehydrated through an ethanol series and stored at -20°C until use.

In situ hybridisation and immunostaining

In situ hybridisation was performed as previously described (Oxtoby and Jowett, 1993). Antisense DIG-labelled probes for *neurog1* (Blader et al., 1997), *gfp* (Blader et al., 2003), *neurod4* (Park et al., 2003), *deltaA*

(Haddon et al., 1998), *olfactory marker protein* (Celik et al., 2002), *robo2* (Lee et al., 2001), *gefilitin* (*inab* – Zebrafish Information Network) (Asch et al., 1998), *olfactomedin 1b* (Nakaya and Tomarev, 2007) and *insulinoma-associated 1b* (Lukowski et al., 2006) were generated using standard procedures. In situ hybridisations were visualised using either BCIP and NBT (Roche) or Fast Red (Roche) as substrates. Immunohistochemical staining was performed as previously described (Masai et al., 1997) using either anti-GFP (1/1000, Torrey Pines Biolabs), zns-2 (1/250) (Trevarrow et al., 1990), anti-HuC/D (1/500, Molecular Probes), anti-Myc (1/10) (Evan et al., 1985), PCAM (1/500) (Mizuno et al., 2001) and SV2 [1/20; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) at University of Iowa]; secondary antibodies used were Alexa 488- or Alexa 555-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1/1000, Molecular Probes).

Antisense morpholino injection and mis-expression constructs

For morpholino knockdowns, embryos were injected at the one-cell stage with either of two morpholinos specific for *neurod4*, *neurod4-MO1* and *neurod4-MO2*, using the previously described concentrations (Park et al., 2003). For Ngn1 and Neurod4 mis-expression studies, the pI-Sce1-hsp70:myc-*neurod4* vector was construct using the strategy previously described for the generation of pI-Sce1-hsp70:myc-*ngn1* (Halloran et al., 2000; Madelaine and Blader, 2011; Thermes et al., 2002); for reintroducing Neurod4 activity in *neurog1* mutant embryos, a myc-tagged coding region of the gene was fused to 8.4 kb of genomic DNA upstream of the *Neurog1* initiation codon using the previously described Tol2kit (Blader et al., 2003; Kwan et al., 2007). The resulting constructs were injected as previously described (Madelaine and Blader, 2011).

BrdU labelling, image acquisition and cell counting

For birthdating, embryos were incubated on ice in fish water supplemented with 10 mM 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and 8% DMSO for 20 minutes. Subsequently, embryos were incubated at 28.5°C in the continued presence of 10 mM BrdU until the desired stage was reached; embryos incubated in BrdU beginning at 8, 12, 16 and 20 hours post-fertilisation (hpf) were fixed at 24 hpf and embryos incubated from 24 hpf were fixed

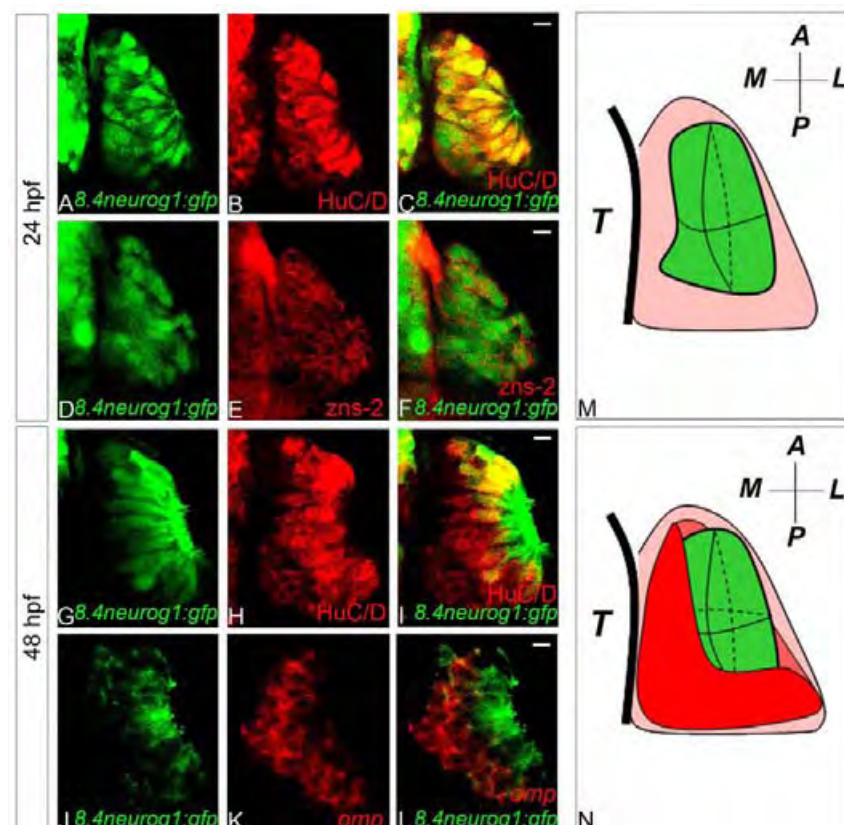


Fig. 1. *Tg(8.4neurog1:gfp)* is a marker of zebrafish early-born olfactory neurons.

(A-F) Single confocal sections of olfactory placodes showing co-expression of HuC/D (A-C) or the previously described pioneer neuron marker zns-2 (D-F) with GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene at 24 hpf. (G-L) Single confocal sections of olfactory placodes showing immunolabelling of HuC/D (G-I) or in situ hybridisation and immunolabelling of *omp* (J-L) and GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene at 48 hpf. Whereas all GFP-positive cells in the placode are HuC/D- and zns-2-positive at 24 hpf, at 48 hpf HuC/D+/GFP- cells are present; little, if any, overlap is detected between the expression of *omp* transcripts and GFP at 48 hpf. (M,N) Schematics of olfactory placodes at 24 hpf (M) or 48 hpf (N). Early-born olfactory neurons are shown in green and olfactory sensory neurons in red. A, anterior; L, lateral; M, medial; P, posterior; T, telencephalon. Scale bars: 10 μm.

at 28 hpf. BrdU incorporation was detected by immunohistochemistry using an anti-BrdU antibody (G3G4, 1/500, DSHB). Confocal acquisitions were carried out using a Leica SP5 confocal microscope. Images were manipulated using Photoshop (Adobe) software. For cell counting, confocal stacks were analysed using ImageJ software.

RESULTS

Tg(8.4neurog1:gfp) is a marker of early-born olfactory neurons in the zebrafish olfactory placode

The expression of the proneural gene *neurogenin1* (*neurog1*) at the border between the neural and non-neural ectoderm in the anterior part of the neural plate suggests that this basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor is involved in the development of early-born olfactory neurons and/or olfactory sensory neurons (Blader et al., 1997). To address this possibility, we first mapped GFP expression driven from a transgene carrying a subset of *neurog1* regulatory elements, *Tg(8.4neurog1:gfp)*, relative to these two neural populations (Blader et al., 2003). Although this transgene only recapitulates a part of the overall *neurog1* expression pattern, the expression of *neurog1* transcripts overlaps with the GFP driven by the transgene in the olfactory system at early stages (see Fig. S1D,D' in the supplementary material). Furthermore, the persistence of GFP at later stages allows us to use the transgene as a short-term lineage label after endogenous *neurog1* expression is no longer detected in the developing olfactory placode (see Fig. S1E-G' in the supplementary material). At 24 hpf, all GFP+ cells in the olfactory placode express the early marker of post-mitotic neurons HuC/D (Elavl3/4 – Zebrafish Information Network) (Fig. 1A-C,M). Similarly, all transgene positive cells are recognised by the zns-2 antibody, previously described as a marker of pioneer neurons in the zebrafish olfactory placode (Fig. 1D-F,M) (Trevarrow et al., 1990; Whitlock and Westerfield, 1998). Thus, at 24 hpf *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ neurons are the only post-mitotic cells in the olfactory placode and all appear to be pioneer neurons. By 48 hpf, the size of the olfactory placode has increased. Nonetheless, the number of *Tg(8.4neurog1:gfp)*-expressing cells remains unchanged after the first day of development; 95.15 ± 11.77 *Tg(8.4neurog1:gfp)*-positive cells at 24 hpf versus 94.40 ± 13.32 at 36 hpf. Also, whereas at 24 hpf all HuC/D-positive cells are GFP positive, at 48 hpf a significant proportion of the HuC/D-positive cells is negative for transgene expression (Fig. 1G-I). In contrast to GFP+ neurons, which are located superficially in the olfactory placode at 48 hpf, the HuC/D+;*Tg(8.4neurog1:gfp)*- cells are located closer to the telencephalon. Olfactory sensory neurons can be visualised at 48 hpf by the expression of the olfactory marker protein (*omp*) gene (Sato et al., 2005). Similar to the HuC/D+;*Tg(8.4neurog1:gfp)*- cells, cells expressing *omp* are located more deeply in the olfactory placode at this stage (Fig. 1J-L). Thus, at 48 hpf the olfactory placode can be schematically represented as an inner HuC/D+;*Tg(8.4neurog1:gfp)*+ population of early-born olfactory neurons (EON) surrounded by an outer cup of *omp*+;*Tg(8.4neurog1:gfp)*- olfactory sensory neurons (OSN; Fig. 1N).

The development of early-born olfactory neurons is affected but not eliminated in *neurog1* mutant embryos

The restricted expression of the *Tg(8.4neurog1:gfp)* reporter line suggests a role for *neurog1* in the generation of EON. Thus, we assessed the development of these neurons in a *neurog1* mutant background at 24 hpf by following the expression of the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene and/or HuC/D (Golling et al., 2002);

expression of the transgene is not regulated by *neurog1* itself and, thus, can be used to count the number of EON in the mutant context (see Fig. S1A-C in the supplementary material). We found that the development of early-born olfactory neurons is affected in *neurog1* mutant embryos with mutant embryos displaying approximately half the number of EONs as their wild-type siblings (Fig. 2A,C and Fig. 5A,B,E); the deficit in neurons is variable between embryos (Fig. 2B-D).

Development of early-born olfactory neurons is delayed in *neurog1* mutant embryos

The reduction in the number of early-born olfactory neurons in *neurog1* mutant embryos at 24 hpf could reflect either that EON are born at the correct time but at a reduced rate or that they are born later. To distinguish between these possibilities, we assessed the deficit at earlier stages in the *neurog1* mutant. At 22 hpf, a clear reduction in the number of HuC/D+ cells is already apparent in *neurog1* mutant embryos relative to wild-type siblings (Fig. 2E,F). More strikingly, at 19 hpf, when the dorsal telencephalic and olfactory lineages have become visibly segregated, a complete absence of HuC/D neurons is apparent in the olfactory anlagen in *neurog1* mutant embryos (Fig. 2G,H). These results suggest that the genesis of EON is delayed in the absence of *neurog1* function.

HuC/D is a marker of post-mitotic neurons. Thus, the delay in the generation of HuC/D+ neurons in the olfactory anlage of *neurog1* mutant embryos suggests that the last cell cycle of EON progenitors is also delayed in the mutant. However, the percentage of post-mitotic EON cannot be assessed accurately at stages prior to the segregation of the telencephalic and olfactory lineages using HuC/D. To address the question of cell-cycle delay differently, we

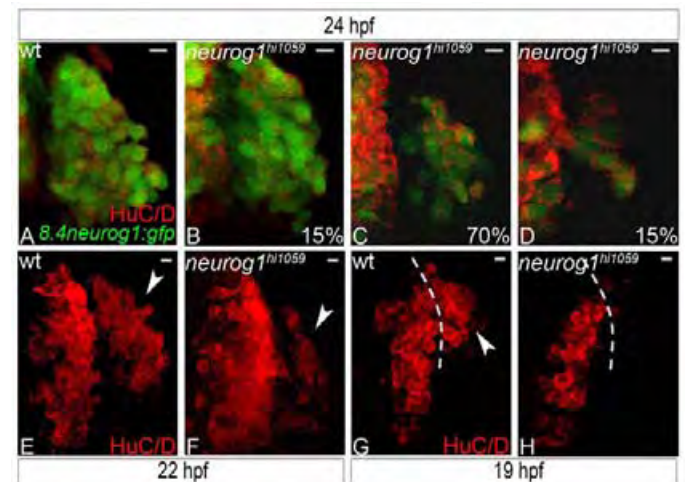


Fig. 2. Zebrafish early-born olfactory neuron development is delayed in the absence of *neurog1* function. (A-D) Confocal projections of wild-type (A) or *neurog1* mutant (B-D) olfactory placodes at 24 hpf labelled for HuC/D and GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene; mutant embryos show a variable but reduced number (shown as percentage of wild type) of early-born olfactory neurons. (E,F) Confocal projections of wild-type (E) or *neurog1* mutant (F) olfactory placodes at 22 hpf labelled for HuC/D; a reduced number of HuC/D-positive neurons is detected in the olfactory placode of mutant embryos at this stage. (G,H) Confocal projections of wild-type (G) or *neurog1* mutant (H) olfactory placodes at 19 hpf labelled for HuC/D; a complete absence of HuC/D neurons is apparent in the olfactory anlagen in *neurog1* mutant embryos. Dashed white line indicates the boundary of the telencephalon and the olfactory placode; arrowheads indicate HuC/D expression in olfactory placode. Scale bars: 10 μ m.

performed experiments using BrdU in *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgenic embryos. When embryos were treated with BrdU continuously from 8 or 12 hpf to 24 hpf, virtually all GFP+ cells are BrdU+, indicating that EON progenitors have yet to undergo their last S-phase at these stages in either wild-type or mutant embryos (Fig. 3G). By contrast, whereas ~90% of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ are BrdU+ when mutant embryos are treated from 16 hpf, only 56% of EONs are labelled in wild-type embryos incubated in BrdU from the same stage (Fig. 3A,D,G). Labelling from 20 hpf leads to an overall reduction in the number of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ that are BrdU+ in either mutant or wild-type embryos. Nonetheless, over twice as many EON progenitors still incorporate BrdU in the mutant relative to wild type at this stage (75±14% in mutants versus 35±15% in wild-type siblings; Fig. 3B,E,G). Finally, very few early-born olfactory neurons incorporate BrdU at 24 hpf in either mutant or wild-type embryos (Fig. 3C,F,G). The differences between the incorporation curves obtained for mutant and wild-type embryos suggests that the last cell cycle of early-born olfactory neurons is delayed in the absence of Neurog1 function. Furthermore, our BrdU experiments support our counts of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ neurons at 24 and 36 hpf that suggested that few EON progenitors are cycling after 24 hpf in either genetic context.

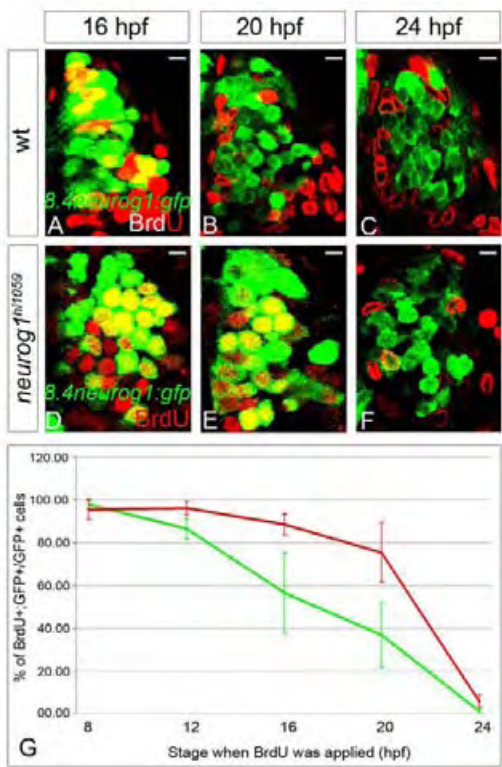


Fig. 3. The last S-phase of early-born olfactory neurons is delayed in the *neurog1* mutant zebrafish. (A-F) Confocal sections of olfactory placodes immunolabelled for BrdU (red) and GFP (green) from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene in wild-type (A-C) or *neurog1* mutant (D-F) embryos at 24 hpf (A,B,D,E) or 28 hpf (C,F). The stages at which BrdU incubation were started is indicated. Scale bars: 10 μM. (G) The proportion BrdU+/GFP+ cells over total number of GFP+ cells in the olfactory placode after BrdU treatment in wild-type (green line) or *neurog1* mutant (red line) embryos. Although early-born olfactory neurons generally leave the cell cycle later in mutant than in wild-type embryos, at 24 hpf few, if any, early-born olfactory neurons are still cycling in either genetic context. Error bars represent s.d.

Neurod4 acts redundantly with Neurog1 during development of early-born olfactory neurons

Although *neurog1* plays an apparently important role for the development of early-born olfactory neurons in the zebrafish, the incomplete penetrance of the EON deficit in *neurog1* mutant embryos suggests that there are other proneural factors with at least partially overlapping functions. The *neurod4* gene encodes a transcription factor with a bHLH domain highly similar to that of Neurog1 (Park et al., 2003; Wang et al., 2003). Furthermore, Neurog1 and Neurod4 have redundant functions during the development of some cranial ganglia in zebrafish (Park et al., 2003); correspondingly, a variety of potential target genes behave identically after mis-expression of the two proneural factors (see Fig. S2E-G' in the supplementary material; data not shown). Thus, we analysed the expression of *neurod4* to address the possibility of redundancy with *neurog1* during neurogenesis in the zebrafish olfactory placode.

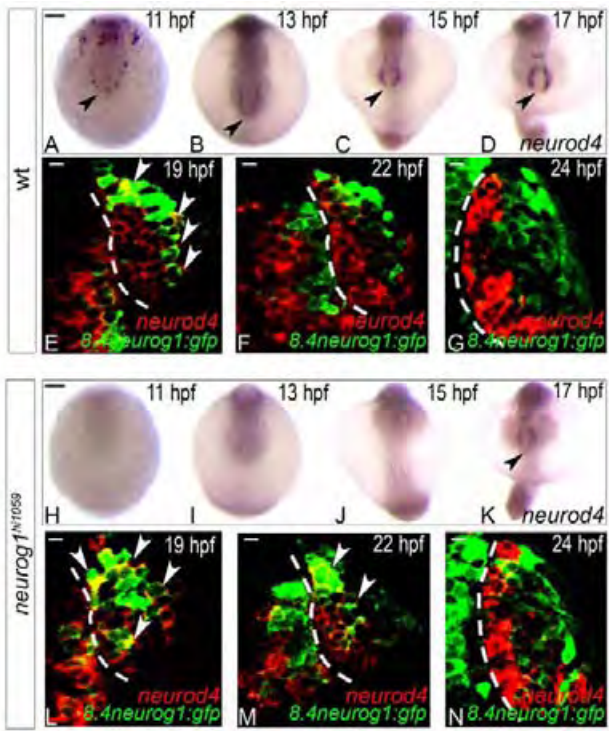


Fig. 4. Expression of *neurod4* in the zebrafish olfactory anlage is dependent on *neurog1* at early but not late stages. (A-D,H-K) Whole-mount in situ hybridisation against *neurod4* in wild-type (A-D) and *neurog1* mutant (H-K) embryos at 11 (A,H), 13 (B,I), 15 (C,J) and 17 (D,K) hpf. Although *neurod4* expression is absent in mutant embryos up to 15 hpf, expression recovers to wild-type levels at 17 hpf. Embryos are viewed dorsally with anterior down; black arrowheads indicate the mixed telencephalo-olfactory expression domain. (E-G,L-N) Single confocal sections of in situ hybridisation and immunolabelling against *neurod4* and GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene in the olfactory placode of wild-type (E-G) or *neurog1* mutant (L-N) embryos at 19 (E,L), 22 (F,M) and 24 (G,N) hpf. At 24 hpf, *neurod4* is restricted to cells of the olfactory placode immediately adjacent to the telencephalon and is excluded from *Tg(8.4neurog1:gfp)*-positive early-born olfactory neurons. White arrowheads indicate double-labelled cells. Dashed white line indicates the boundary of the telencephalon and the olfactory placode. Scale bars: in A, 100 μM for A-D; in H, 100 μM for H-K; in E-G,L-N, 10 μm.

The expression pattern of *neurod4* resembles that of *neurog1* (Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998; Park et al., 2003; Wang et al., 2003). In the developing olfactory system, *neurod4* expression is first detected at 11 hpf in cells at the boundary of the anterior neural plate, shortly after the onset of expression of *neurog1* (Fig. 4A) (Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998). Increasing levels of *neurod4* expression in this region accompany the convergence of the anterior neural plate such that by 17 hpf strong expression is detected in the mixed telencephalo-olfactory lineage (Fig. 4B-D); during this period *neurod4* expression overlaps broadly with *neurog1* and the proneural target gene *deltaA* (see Fig. S3A-I in the supplementary material) (Haddon et al., 1998). At 19 hpf, when the telencephalic and olfactory lineages have segregated, robust *neurod4* expression is detected in both territories (Fig. 4E). Expression of *neurod4* continues in the developing olfactory placode at 22 hpf where it is largely excluded from *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ cells (Fig. 4F). Finally, at 24 hpf the expression of *neurod4* is detected as an outer cup of cells surrounding the population of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ neurons (Fig. 4G). Surprisingly, the expression of *neurod4* is absent in *neurog1* mutant embryos up to 17 hpf (Fig. 4H-J). Furthermore, mis-expression of *Neurog1* rapidly induces the expression of *neurod4*, suggesting that it is a direct target gene at stages up to 17 hpf (see Fig. S2C-D' in the supplementary material); mis-expression of *Neurod4* does not induce *neurog1* expression (see Fig. S2A-B' in the supplementary material). At later stages, however, the expression of *neurod4* in the olfactory placode is reminiscent of that in wild-type embryos (Fig. 4D-G versus K-N). Thus, the recovery of *neurod4* expression at 17 hpf in *neurog1* mutant embryos is in agreement with a role for the gene in the generation of residual EONs in absence of *neurog1* function.

Next, we used a morpholino knockdown approach alone or in the *neurog1* mutant background to confirm a role for *neurod4* in the development of early-born olfactory neurons. As described above, there is a 57% reduction in the number of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ neurons in *neurog1* mutant embryos (Fig. 5A,B,E). There is also a significant, although mild, reduction in the

number of EONs in *neurod4* morphants alone (Fig. 5C,E); co-injection with a *p53* morpholino has no effect on this reduction (data not shown). Simultaneous abrogation of both *neurod4* and *neurog1* function, however, reduces the number of EONs by 80% relative to wild type (Fig. 5D,E); this reduction is significantly greater when compared with counts in *neurog1* mutant embryos alone (Fig. 5E). Finally, re-introduction of *Neurod4* partially rescues the EON deficit in *neurog1* mutant embryos, suggesting that the proneural function of the two genes is interchangeable (Fig. 5E). We conclude from our expression studies and functional analyses that the generation of early-born olfactory neurons is controlled by the partially redundant activities of *Neurog1* and *Neurod4*.

Neurog1 and Neurod4 redundantly control olfactory sensory neurons development

The expression of *neurod4* in the olfactory placode at 24 hpf is excluded from *Tg(8.4neurog1:gfp)*-positive neurons (Fig. 4G). Furthermore, our birthdating studies indicate that the cells at this position incorporate BrdU at this stage (Fig. 3C). These results suggest that *neurod4*-expressing cells at 24 hpf are cycling neural progenitors. As few, if any, early-born neurons remain in the cell cycle at this stage, we conclude that these *neurod4*-expressing cells are progenitors of OSNs.

To investigate the role of *neurod4* in the development of OSNs, we analysed the expression of markers of neural progenitors in *neurod4* morphant embryos. The transcription of *deltaA* is directly regulated by proneural genes in neural progenitors (Madelaine and Blader, 2011). Likewise, a second target of proneural genes, *insulinoma-associated 1b (insm1b)* is expressed in the olfactory placode during development (see Fig. S4A-C in the supplementary material) (Castro et al., 2006; Lukowski et al., 2006); *deltaA* and *insm1b* expression are comparable to that of *neurod4* at 24 hpf (Fig. 6A,A'; see Fig. S4G in the supplementary material). A similar pattern of *deltaA* or *insm1b* expression is detected in embryos injected with the *neurod4* morpholino, suggesting that, as for EONs, redundancy between proneural factors exists during the

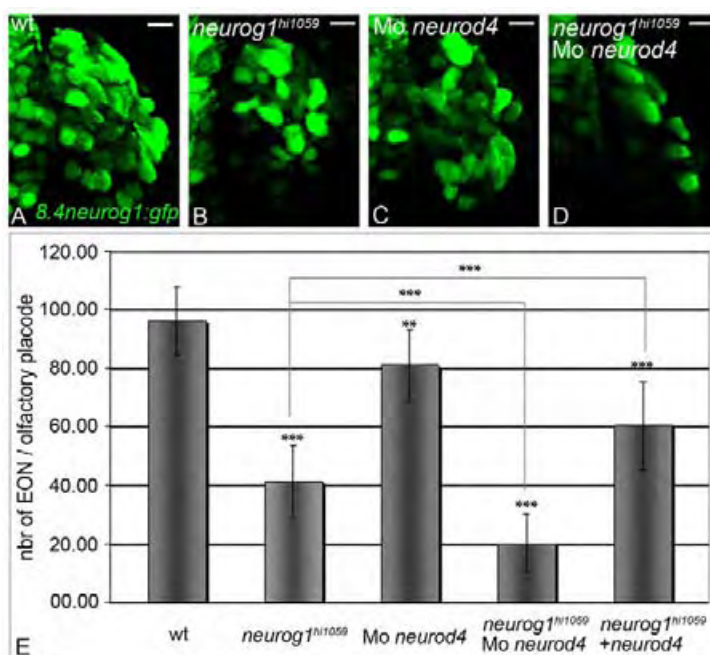


Fig. 5. Neurog1 and Neurod4 act redundantly during development of zebrafish early-born olfactory neurons.

(A-D) Confocal projections of GFP from the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene in the olfactory placode of wild-type (A), *neurog1* mutant (B), *neurod4* morphant (C) and *neurog1/neurod4* double loss-of-function (D) embryos at 24 hpf. Abrogation of both *Neurod4* and *Neurog1* function leads to a severe deficit in the differentiation of early-born olfactory neurons. Placodes are oriented with anterior up. Scale bars: 10 μ M. (E) Counts of early-born olfactory neurons per placode at 24 hpf in wild-type, *neurog1* mutant, *neurod4* morphant, *neurog1/neurod4* double loss-of-function embryos and *neurog1* mutant embryos in which *Neurod4* has been mis-expressed. A minimum of twelve olfactory placode was analysed for each context. Error bars represent s.d. * P <0.05, ** P <0.001, *** P <0.0005, determined by *t*-test.

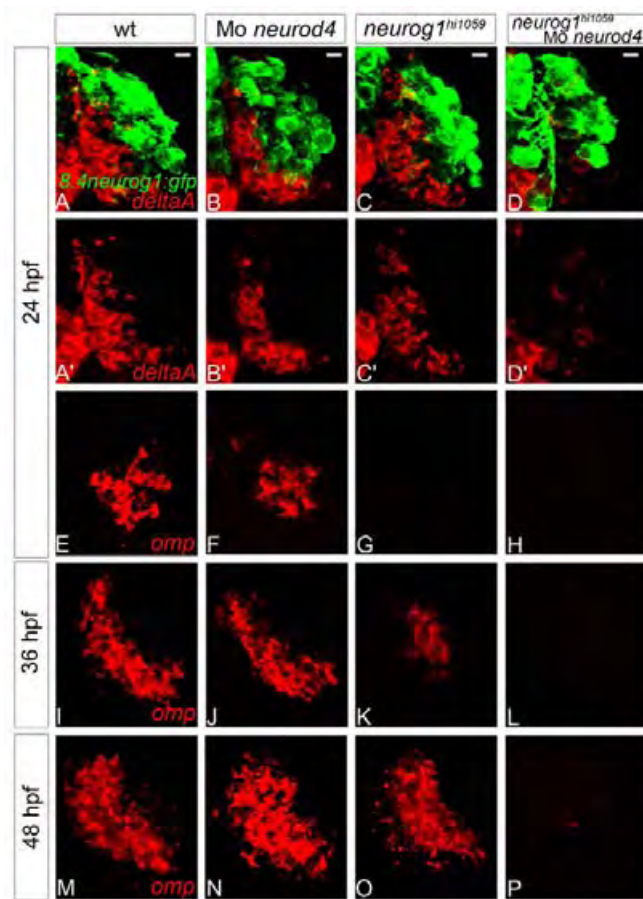


Fig. 6. Neurod4 and Neurog1 act redundantly during OSN development in zebrafish. (A-D') Confocal projections of in situ hybridisation and immunolabelling against *deltaA* and GFP in wild-type (A,A'), *neurod4* morphant (B,B'), *neurog1* mutant (C,C') and *neurog1/neurod4* double loss-of-function (D,D') olfactory placodes of *Tg(8.4neurog1:GFP)* embryos at 24 hpf. Although no difference is apparent in the expression of *deltaA* in single loss-of-function embryos relative to wild-type siblings, *deltaA* expression is absent when both *neurog1* and *neurod4* function is abolished. (E-P) Confocal sections of in situ hybridisation labelling against olfactory marker protein (*omp*) in wild-type (E,I,M), *neurod4* morphant (F,J,N), *neurog1* mutant (G,K,O) and *neurog1/neurod4* double loss-of-function (H,L,P) olfactory placodes at 24 (E-H), 36 (I-L) and 48 (M-P) hpf. Although *omp* expression resembles the wild-type pattern in the single loss-of-function context at 48 hpf, there is a delay in the initiation of *omp* expression in the absence of Neurog1 function. The expression of *omp* is never detected when both *neurog1* and *neurod4* function is abolished. Scale bars: 10 μ m.

development of OSNs (Fig. 6B,B'; see Fig. S4H in the supplementary material). Although *neurog1* is no longer expressed in the olfactory placode at 22 hpf, residual expression can be detected up to 20 hpf leaving open the possibility that *neurog1* also acts together with *neurod4* during the early phase of OSN development (see Fig. S1E-G' in the supplementary material). Consistent with this idea, whereas *deltaA* and *insm1b* expression is unaffected in *neurog1* mutant embryos at 24 hpf (Fig. 6C,C'; see Fig. S4D-F,I in the supplementary material), no *deltaA* or *insm1b* expression is detected in embryos lacking both *neurod4* and *neurog1* function (Fig. 6D,D'; see Fig. S4J in the supplementary material).

Next, we analysed the effect of abrogating *neurod4* and/or *neurog1* function on the expression of a marker of specified OSNs, *omp* (Sato et al., 2005). As for *deltaA*, *omp* expression in *neurod4* morphants is indistinguishable from wild type at all stages analysed (Fig. 6E,I,M versus F,J,N). On the contrary, whereas *omp* expression in *neurog1* mutant embryos resembles that in wild-type siblings at 48 hpf, expression is severely reduced in the mutant at 36 hpf and cannot be detected at 24 hpf (Fig. 6G,K,O); in the absence of both *neurod4* and *neurog1* activity the expression of *omp* is missing at all stages up to 48 hpf (Fig. 6H,L,P). We conclude that the redundant function of *neurod4* and *neurog1* is necessary for the formation of OSNs.

Neurog1 controls aspects of early-born olfactory neuron behaviour

Our results suggest that the majority of the residual EONs present in *neurog1* mutant embryos finish their last S-phase after 20 hpf. This correlates with the late onset of *neurod4* expression, which becomes independent of Neurog1 a few hours earlier. Thus, future EONs appear to express bHLH proneural factors for a significantly shorter time in the absence of Neurog1 function, from 16-24 hpf rather than 10-24 hpf as in wild type. We, thus, asked whether this shortened time window of proneural expression is nonetheless sufficient for EONs that are born in *neurog1* mutant embryos to acquire all aspects of their genetic programme.

The zebrafish *robo2* gene encodes a transmembrane receptor protein of the immunoglobulin superfamily. The expression of *robo2* in the olfactory system begins at 20 hpf, is robust between 24 and 36 hpf, after which its expression quickly diminishes (Miyasaka et al., 2005). We find that *robo2* expression overlaps completely with the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene at 24 and 36 hpf in wild-type embryos, suggesting that it is specific to EONs (Fig. 7A-C,J-L). In contrast to the wild-type situation, *robo2* expression is not detected in *Tg(8.4neurog1:gfp)*⁺ cells in *neurog1* mutant embryos at 24 hpf and never significantly recovers in the mutants at later stages (Fig. 7D-F,M-O; data not shown). Similarly, the expression of *olfactomedin 1b* (*olfm1b*) and *gefiltin* (*gef*) is restricted to EONs at 24 hpf in wild-type embryos and is absent from *neurog1* mutant olfactory placodes (see Fig. S5A-L in the supplementary material) (Asch et al., 1998; Nakaya and Tomarev, 2007). Thus, although neurons with certain characteristics of EONs can develop in the absence of Neurog1 function, not all aspects of EON specification are apparent. Importantly, re-introduction of Neurod4 expression under the control of *neurog1* regulatory elements leads to a partial rescue of *robo2* expression at 24 hpf (Fig. 7G-I); *robo2* does not behave as a direct target of either Neurog1 or Neurod4 (see Fig. S2H-J' in the supplementary material). We conclude, therefore, that the failure of late EON markers, such as *robo2*, to recover in *neurog1* mutant embryos reflects the change in the time window of exposure to proneural activity and not to differences in the intrinsic activities of Neurog1 and Neurod4.

The activity of Robo2 is required for fasciculation of axons as they project to the olfactory bulb (Miyasaka et al., 2005). Likewise, the organisation of proto-glomeruli in the olfactory bulb is also disturbed in the *robo2* mutant, *astray* (Miyasaka et al., 2005). The failure of *robo2* expression to recover in EONs in *neurog1* mutant embryos suggests that these processes might be compromised in the early-born olfactory neurons that develop in the absence of Neurog1 function. Thus, we analysed the fasciculation of olfactory axons and the formation of proto-glomeruli in the *neurog1* mutant background by performing immunostaining against PCAM

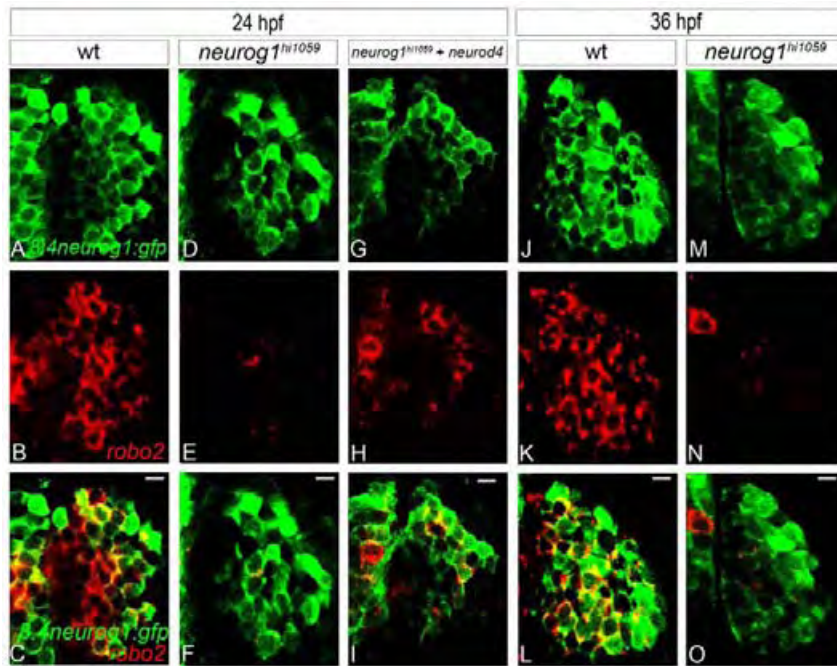


Fig. 7. In *neurog1* mutant zebrafish embryos, residual early-born olfactory neurons fail to express certain EON markers. (A-I) Confocal sections of in situ hybridisation and immunolabelling against *robo2* and GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene at 24 hpf in wild type (A-C), *neurog1* mutant embryos (D-F) and *neurog1* mutant embryos in which Neurod4 has been mis-expressed (G-I). Whereas early-born olfactory neurons in wild-type embryos robustly express *robo2*, expression is absent in *neurog1* mutant embryos; mis-expression of Neurod4 partially rescues *robo2* expression. (J-O) Confocal sections of in situ hybridisation and immunolabelling against *robo2* and GFP from the *Tg(8.4neurog1:GFP)* transgene in wild-type (J-L) and *neurog1* mutant (M-O) embryos at 36 hpf. The expression of *robo2* never recovers in the few early-born olfactory neurons that develop in *neurog1* mutant embryos. Scale bars: 10 μ m.

(Ncam1b – Zebrafish Information Network) and SV2; PCAM labels olfactory axons and their termini and, together with the synaptic vesicle protein SV2, highlights proto-glomeruli in the developing olfactory bulb (Miyasaka et al., 2005; Mizuno et al., 2001). In wild-type embryos, PCAM+ olfactory axons form a single fasciculated tract until they enter the telencephalon where they disperse to form distinct PCAM+/SV2+ proto-glomeruli (Fig. 8A-C,J-L). By contrast, in *neurog1* embryos, olfactory axons are often defasciculated in a manner similar to *ast* mutants (Fig. 8D-F). In several cases, we detected aberrant projections of olfactory axons as soon as they leave the olfactory placode or subsets of projections that are apparently incapable of leaving the placode (Fig. 8G-I; see Fig. S6A-L in the supplementary material). Finally, in the *neurog1* mutant embryos, PCAM+/SV2+ proto-glomeruli appear less well organised (Fig. 8M-O). Together, these results suggest that failure of the expression of *robo2* to recover in EONs of *neurog1* mutant embryos has effects on the organisation of the projections of mature olfactory neurons. Furthermore, we propose that the combined failure of the expression of *robo2* and other genes, such as *gef* and *olm1b*, to recover in *neurog1* mutant EONs underlies the fact that the *neurog1* phenotype is generally stronger than that of *robo2* mutants.

DISCUSSION

In the present study, we describe the role of two proneural genes, *neurog1* and *neurod4*, during olfactory neurogenesis in the early zebrafish embryo. Our results suggest that these genes have largely redundant functions during the development of olfactory neurons. Interestingly, the early phase of *neurod4* expression requires Neurog1. As a consequence of this partial redundancy, there is a delay in the development of olfactory neurons in the *neurog1* mutant (schematically represented in Fig. 9). Here, we discuss these results relative to previous studies in the zebrafish and mouse.

Our interest in identifying proneural genes required for the development of olfactory neurons in the zebrafish led us to characterise the expression of the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene in

the olfactory system (Blader et al., 2003). We found that at 24 hpf, GFP expression is restricted to post-mitotic neurons in the olfactory placode. As all GFP+ cells are recognised by the antibody zns-2, we initially concluded that the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene is a novel marker of pioneer neurons; zns-2 was originally described as a marker of pioneer neurons (Whitlock and Westerfield, 1998). However, whereas our counts suggest that there are ~95 GFP+/zns-2+ cells per placode, only 11 zns-2+ neurons/placode were reported in the initial characterisation of zns-2 expression at the same stages (Whitlock and Westerfield, 1998). We subsequently performed birthdating studies on *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ cells. Again our results differ from those of earlier work; based on single cell fate mapping and morphological criteria it was previously shown that pioneer neurons are post-mitotic by 12 hpf (Whitlock and Westerfield, 1998; Whitlock and Westerfield, 2000), but our results indicate that *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ cells can incorporate BrdU up to 20-24 hpf. An explanation for these discrepancies is that only a subset of GFP+ cells are in fact pioneer neurons; the corollary being that zns-2 is not a specific marker of pioneer neurons, an idea supported by the limited co-expression of the olfactory sensory neuron marker *Tg(omp:YFP)* and zns-2 (Miyasaka et al., 2007). However, it does not appear that the majority of *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ cells are olfactory sensory neurons either as only a few cells co-express *omp* and the *Tg(8.4neurog1:gfp)* transgene (R.M. and P.B., unpublished observations). It is apparent, therefore, that there is more heterogeneity in olfactory neurons subtypes than previously appreciated. To avoid confusion with the previous ‘pioneer/OSN’ nomenclature, we have chosen to refer to the *Tg(8.4neurog1:gfp)*+ neurons described in our study as early-born olfactory neurons (EONs) rather than pioneer neurons. The characterisation of novel molecular markers should help refine our understanding of the complexity of early neural subtypes in this system.

The conserved role of Foxg1 and members of the miR-200 microRNA family during early olfactory development in mice and zebrafish suggests an overall conservation of developmental strategy for the olfactory system in these two species (Choi et al., 2008;

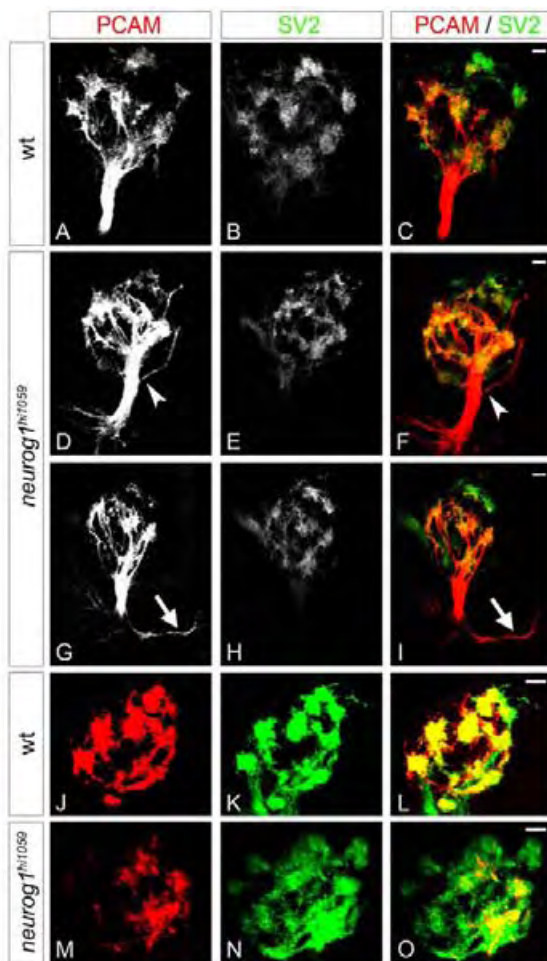


Fig. 8. The fasciculation of olfactory axons and organisation of proto-glomeruli are flawed in *neurog1* mutant zebrafish embryos. (A-I) Confocal projections of immunolabelling against PCAM and SV2 of olfactory projections in wild-type (A-C) and *neurog1* mutant (D-I) embryos at 72 hpf. Whereas projections in wild-type embryos form a single fasciculated tract from the olfactory placode to the olfactory bulb, fasciculation (arrowheads in D,F) is aberrant in *neurog1* mutant embryos; certain mutant embryos display abnormal guidance of projections immediately after they leave the placode (arrows in G,I). (J-O) Confocal projections of immunolabelling against PCAM and SV2 in the olfactory bulb in wild-type (J-L) and *neurog1* mutant (M-O) embryos at 72 hpf. Proto-glomeruli appear less well organised in *neurog1* mutant embryos relative to wild-type siblings. Embryos are viewed frontally (A-I) or dorsally with anterior up (J-O). Scale bars: 10 μ M.

Duggan et al., 2008); the conserved role of Robo2 would seem to confirm this idea (Cho et al., 2007). Our study, however, shows that this is not completely the case as although in the mouse olfactory sensory epithelium *Ascl1* acts as the dominant proneural factor, in the zebrafish a redundant pair of Atonal family members, *neurog1* and *neurod4*, play this role (this study) (Cau et al., 2002; Cau et al., 1997; Guillemot et al., 1993). The significance of this difference is not clear. Knock-in experiments in the mouse have shown that *Ngn2* can effectively replace *Ascl1* in the development of the mouse olfactory epithelium, suggesting that there is no apparent 'specification role' for the proneural gene used after olfactory neurons are determined (Parras et al., 2002). However, the deficit in

early-born olfactory neurons in the *neurog1* mutant in zebrafish can be rescued by the mis-expression of *Neurog1* but not *Ascl1a* (R.M. and P.B., unpublished observations). We conclude that the choice of proneural gene is, at least in the case of EONs, crucial for correct specification of neural sub-type identity in the zebrafish olfactory system. It is possible that there is no equivalent to zebrafish early-born olfactory neurons in the mouse. Furthermore, *ascl1a* is expressed in a restricted domain of OSN progenitors in the zebrafish olfactory placode at 24 hpf, suggesting that it might have a role to play in the development of OSN in the zebrafish, as it does in the mouse (R.M. and P.B., unpublished observations). However, in the *ascl1a* mutation, *pituitary absent (pia)*, we have not detected defects in olfactory neurogenesis (R.M. and P.B., unpublished observations) (Pogoda et al., 2006). Moreover, the abrogation of both *neurog1* and *neurod4* activity is sufficient to eliminate OSN development up to 48 hpf, indicating that at best *ascl1a* acts downstream of the combined activity of these two genes. The question of whether there is a later role for *Ascl1a* during olfactory neurogenesis in the zebrafish remains open.

The correct development of early-born and mature olfactory sensory neurons in the zebrafish olfactory placode requires the redundant activity of *Neurog1* and *Neurod4*. Our data also suggest that *neurod4* is a transcriptional target of *Neurog1* up to 17 hpf, after which its expression becomes independent of *Neurog1* activity. The timing of the recovery of cell-cycle exit of early-born olfactory neurons in the olfactory placode of *neurog1* mutant zebrafish embryos coincides with the recovery of *neurod4* expression in the mutant and our rescue experiments suggest that the expression of either gene is sufficient to drive the progenitors of early-born olfactory neurons out of the cell cycle. In the mouse, it has been suggested that *Neurod4* (also known as *Math3*) synergises with *Neurog2* during cortical development (Mattar et al., 2008); physical interaction between these bHLH proteins has been shown to lead to an increased efficiency in target gene induction. Furthermore, *Neurod4* behaves as a *Neurog2* target gene in the mouse cortex highlighting similarities between the two systems. However, it is not clear whether *Neurog2* and *Neurod4* have truly redundant functions in the mouse as, to our knowledge, double *Neurog2-Neurod4* loss-of-function studies have not been reported for the cortex. It is also not clear whether *Neurog1* and *Neurod4* synergise to regulate the transcription of targets in the zebrafish olfactory system. A slight reduction in the number of early-born olfactory neurons is detected in *neurod4* morphant embryos. However, it remains unclear whether this reflects that *Neurog1* functions less well in the absence of *Neurod4* or that the last early-born neurons cannot develop in the *neurod4* morphant once *neurog1* expression stops in the olfactory placode at 20 hpf.

Our BrdU experiments suggest that early-born olfactory neurons begin to exit the cell cycle between 10 and 12 hpf in wild-type embryos, shortly after the expression of *neurog1* is initiated in the anlage of the zebrafish olfactory placodes. Furthermore, we show that early-born olfactory neurons in *neurog1* mutant embryos initiate their last S-phase after 16 hpf, concomitant with the recovery of expression of *neurod4*. However, virtually all early-born olfactory neurons in both wild-type and *neurog1* mutant embryos are post-mitotic at 24 hpf; the stable number of *Tg(8.4neurog1:gfp)+* neurons in both wild type or mutants after 24 hpf is consistent with this idea. Thus, although the development of these neurons is apparently initiated by the expression of *neurog1* or *neurod4*, even with the sustained expression of *neurod4* in cycling progenitors after 24 hpf early-born olfactory neurons can

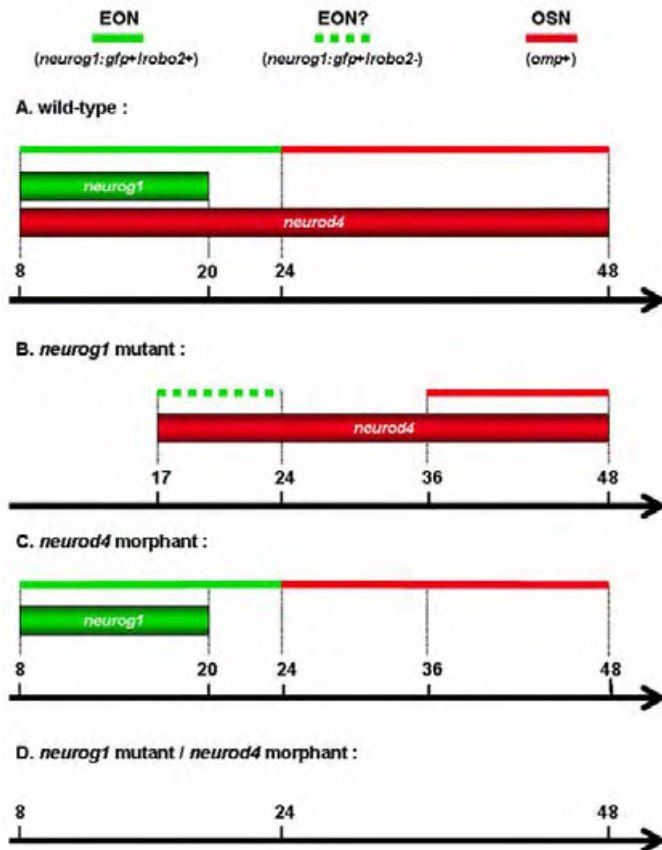


Fig. 9. Schematic of neurogenesis in the zebrafish olfactory placode. (A-D) A schematic recapitulation of olfactory neurogenesis in wild-type (A), *neurog1* mutant (B), *neurod4* morphant (C) and *neurog1/neurod4* double loss-of-function (D) embryos. The period of expression of *neurog1* and *neurod4* are shown as thick green and red bars, respectively, and the birth of the different types of olfactory neurons is shown as thin bars. *Neurog1* and *Neurod4* share redundant activity during the development of early-born olfactory neurons (EON) and olfactory sensory neurons (OSN). Furthermore, in the absence of *Neurog1* the complete specification of early-born olfactory neurons is never achieved and the early phase of OSN differentiation is delayed. In double loss of function of *neurog1* and *neurod4*, virtually all early-born olfactory neurons and olfactory sensory neurons are lost in the developing olfactory placode.

no longer be generated. The mechanism that controls the end of the determination phase of early-born olfactory neurons development is not known. One possibility is that from the earliest stages of olfactory neurogenesis there are separate progenitor lineages for early and late neuronal sub-types and the progenitor pool for the early-born neurons is exhausted at 24 hpf. A previous study has shown that distinct progenitors exist for pioneer neurons and olfactory sensory neurons (Whitlock and Westerfield, 2000). However, it is not clear whether this is also the case for the *Tg(8.4neurog1:gfp)*⁺ neurons and OSNs; although limited, the overlap of *zns-2* and *Tg(omp:YFP)* argues against this idea (Miyasaka et al., 2005). Furthermore, even though the development of early-born neurons is delayed in *neurog1* mutants, these neurons also stop being generated at 24 hpf in the mutant, suggesting either that the pool of progenitors is smaller to start with in the absence of *Neurog1* function or that parallel mechanisms actively repress the birth of the early-born population after 24 hpf.

Redundancy between transcription factors of the same families is not particularly novel. Indeed, the overlapping roles of the *Neurog1* and *Neurog2* genes during dorsal root ganglion (DRG) development in the mouse is similar to that of *Neurog1* and *Neurod4* during olfactory neurogenesis in the zebrafish (Ma et al., 1999) (this study). Indeed, in mouse the early (*TrkB*⁺ and *TrkC*⁺; *Ntrk2* and *Ntrk3*, respectively – Mouse Genome Informatics) and late (*TrkA*⁺; *Ntrk1* – Mouse Genome Informatics) waves of DRG neurons resemble the early EON and late OSN waves we describe in the zebrafish olfactory placode. Moreover, the early phase of *Neurog1* expression depends on *Neurog2* function in mouse DRGs as does *neurod4* on *Neurog1* in the fish olfactory placode. Nonetheless, there are several differences between the two systems. First, during the late wave of DRG neurogenesis only *Neurog1* is required for *TrkA*⁺ neurons to develop. By contrast, both *Neurog1* and *Neurod4* are necessary for the correct development of late OSN neurons in the fish. Secondly, whereas the delay in the onset of expression of *Neurog1* in *Neurog2* mutant mice ultimately has no effect on the number of early *TrkB*⁺ and *TrkC*⁺ neurons that are born in DRGs (apparently complete redundancy with a delay), development of early olfactory neurons is significantly perturbed in *neurog1* mutants in the fish despite the recovery of *neurod4* expression (only partial redundancy with a delay). A ‘delayed neurogenesis’ phenotype similar to that highlighted in our study has also been reported during the development of the nucleus of the solitary tract (nTS) and sympathetic ganglia in the *Ascl1* knockout mouse (Pattyn et al., 2006); in these structures, neurons appear with a 24 hour delay in the mutant and accumulate at a slower pace. However, although the authors suggested that the sequential expression of two proneural factors could regulate development of the nTS and sympathetic ganglia, the second proneural factor in this system is unknown (Pattyn et al., 2006).

Although there is a delay in the development of the sympathetic ganglia in the *Ascl1* knockout and *TrkB*⁺ and *TrkC*⁺ neurons in *Neurog2* mutant DRGs in the mouse, this delay is eventually overcome in both systems (Ma et al., 1999; Pattyn et al., 2006). Although this also appears to be the case for the development of *omp*⁺ OSNs in the zebrafish, we show that in the absence of *Neurog1* function, markers such as *robo2* are never expressed by the residual neurons that develop before 24 hpf in the *neurog1* mutant. Furthermore, the failure of the expression of *robo2* to recover correlates with abnormal fasciculation of olfactory axons and their correct organisation into proto-glomeruli in the olfactory bulb, phenotypes previously reported for the *robo2* mutant (Miyasaka et al., 2005). The aberrant projection of olfactory axons in some *neurog1* mutant embryos suggests that the expression of other, as yet unidentified, genes also fails to recover in time to permit correct development; our results with *gef* and *olfm1b* show that *robo2* is not the only gene for which expression fails to recover in residual EONs in the *neurog1* mutant. Thus, we propose that the length of developmental time available to early-born olfactory neurons after proneural gene activity drives them to differentiate is a crucial parameter for the correct acquisition of EON identity and for the development of the zebrafish olfactory system. Understanding whether this reflects a general principle during neurogenesis will require further study.

Acknowledgements

We are grateful to Elise Cau, Alice Davy and members of the Blader laboratory for critical reading of the manuscript. We thank Y. Yoshihara, C.-H. Kim, C.-B. Chien, S. Tomarev and A. J. Waskiewicz for the gift of reagents and insightful discussions. We would also like to thank the Toulouse RIO Imaging platform.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Université Paul Sabatier; Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC); Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) [SFI20101201699 to P.B.]; and the Ministère de la Recherche. R.M. was financed by the Ministère de la Recherche and ARC. L.G. was financed by the Ministère de la Recherche.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at

<http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.066563/-/DC1>

References

- Asch, W. S., Leake, D., Canger, A. K., Passini, M. A., Argenton, F. and Schechter, N. (1998). Cloning of zebrafish neurofilament cDNAs for plasticin and gefitinil: increased mRNA expression in ganglion cells after optic nerve injury. *J. Neurochem.* **71**, 20–32.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 517–530.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Strahle, U. (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557–4569.
- Blader, P., Plessey, C. and Strahle, U. (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* **120**, 211–218.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B. et al. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell.* **11**, 831–844.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* **124**, 1611–1621.
- Cau, E., Casarosa, S. and Guillemot, F. (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**, 1871–1880.
- Celik, A., Fuss, S. H. and Korsching, S. I. (2002). Selective targeting of zebrafish olfactory receptor neurons by the endogenous OMP promoter. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 798–806.
- Cho, J. H., Lepine, M., Andrews, W., Parnavelas, J. and Cloutier, J. F. (2007). Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *J. Neurosci.* **27**, 9094–9104.
- Choi, P. S., Zakhary, L., Choi, W. Y., Caron, S., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E. A., McManus, M., Harfe, B., Giraldez, A. J., Horvitz, H. R. et al. (2008). Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron* **57**, 41–55.
- Cuschieri, A. and Bannister, L. H. (1975a). The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *J. Anat.* **119**, 471–498.
- Cuschieri, A. and Bannister, L. H. (1975b). The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J. Anat.* **119**, 277–286.
- Dambly-Chaudière, C. and Vervoort, M. (1998). The bHLH genes in neural development. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 269–273.
- Duggan, C. D., DeMaria, S., Baudhuin, A., Stafford, D. and Ngai, J. (2008). Foxg1 is required for development of the vertebrate olfactory system. *J. Neurosci.* **28**, 5229–5239.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3610–3616.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S. et al. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* **31**, 135–140.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. and Modolell, J. (2003). Half a century of neural pre patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 587–598.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**, 463–476.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J. (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359–370.
- Halloran, M. C., Sato-Maeda, M., Warren, J. T., Su, F., Lele, Z., Krone, P. H., Kuwada, J. Y. and Shoji, W. (2000). Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* **127**, 1953–1960.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
- Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z. (1998). Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.* **213**, 92–104.
- Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Parant, J. M., Yost, H. J., Kanki, J. P. and Chien, C. B. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev. Dyn.* **236**, 3088–3099.
- Lee, J. S., Ray, R. and Chien, C. B. (2001). Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration. *Dev. Dyn.* **221**, 216–230.
- Lukowski, C. M., Ritzel, R. G. and Waskiewicz, A. J. (2006). Expression of two *insm1*-like genes in the developing zebrafish nervous system. *Gene Expr. Patterns* **6**, 711–718.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F. and Anderson, D. J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* **13**, 1717–1728.
- Madelaine, R. and Blader, P. (2011). A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of deltaA expression in zebrafish. *Dev. Biol.* **350**, 198–207.
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W. (1997). Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43–57.
- Mattar, P., Langevin, L. M., Markham, K., Klenin, N., Shivji, S., Zinyk, D. and Schuurmans, C. (2008). Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1456–1469.
- Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S. Y., Hutson, L. D., Chien, C. B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y. (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* **132**, 1283–1293.
- Miyasaka, N., Knaut, H. and Yoshihara, Y. (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* **134**, 2459–2468.
- Mizuno, T., Kawasaki, M., Nakahira, M., Kagamiyama, H., Kikuchi, Y., Okamoto, H., Mori, K. and Yoshihara, Y. (2001). Molecular diversity in zebrafish NCAM family: three members with different VASE usage and distinct localization. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 119–130.
- Nakaya, N. and Tomarev, S. (2007). Expression patterns of alternative transcripts of the zebrafish olfactomedin 1 genes. *Gene Expr. Patterns* **7**, 723–729.
- Nicolay, D. J., Doucette, J. R. and Nazarali, A. J. (2006). Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 803–821.
- Oxtoby, E. and Jowett, T. (1993). Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1087–1095.
- Park, S. H., Yeo, S. Y., Yoo, K. W., Hong, S. K., Lee, S., Rhee, M., Chitnis, A. B. and Kim, C. H. (2003). Zath3, a neural basic helix-loop-helix gene, regulates early neurogenesis in the zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 184–190.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* **16**, 324–338.
- Pattyn, A., Guillemot, F. and Brunet, J. F. (2006). Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants. *Dev. Biol.* **295**, 67–75.
- Pogoda, H. M., von der Hardt, S., Herzog, W., Kramer, C., Schwarz, H. and Hammerschmidt, M. (2006). The proneural gene *ascl1a* is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Development* **133**, 1079–1089.
- Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y. (2005). Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J. Neurosci.* **25**, 4889–4897.
- Smart, I. H. (1971). Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *J. Anat.* **109**, 243–251.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J. and Joly, J. S. (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **118**, 91–98.
- Trevarrow, B., Marks, D. L. and Kimmel, C. B. (1990). Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* **4**, 669–679.
- Wang, X., Emelyanov, A., Korzh, V. and Gong, Z. (2003). Zebrafish atonal homologue *zath3* is expressed during neurogenesis in embryonic development. *Dev. Dyn.* **227**, 587–592.
- Whitlock, K. E. and Westerfield, M. (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J. Neurosci.* **18**, 8919–8927.
- Whitlock, K. E. and Westerfield, M. (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* **127**, 3645–3653.
- Yoshihara, Y. (2009). Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system. *Results Probl. Cell Differ.* **47**, 97–120.

BIBLIOGRAPHIE

Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A. and Hamada, H. (1999). Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer. *Genes Dev* **13**, 1589-600.

Adams, D. S., Robinson, K. R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R. C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M. and Levin, M. (2006). Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development* **133**, 1657-71.

Afzelius, B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317-9.

Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K. et al. (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci* **13**, 1354-6.

Aizawa, H., Bianco, I. H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M. L., Russell, C., Wilson, S. W. and Okamoto, H. (2005). Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Curr Biol* **15**, 238-43.

Aizawa, H., Goto, M., Sato, T. and Okamoto, H. (2007). Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. *Dev Cell* **12**, 87-98.

Amendt, B. A., Semina, E. V. and Alward, W. L. (2000). Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1652-66.

Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T. and Okamoto, H. (2010). Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. *J Neurosci* **30**, 1566-74.

Amunts, K., Jancke, L., Mohlberg, H., Steinmetz, H. and Zilles, K. (2000). Interhemispheric asymmetry of the human motor cortex related to handedness and gender. *Neuropsychologia* **38**, 304-12.

Barth, K. A., Miklosi, A., Watkins, J., Bianco, I. H., Wilson, S. W. and Andrew, R. J. (2005). fsi zebrafish show concordant reversal of laterality of viscera, neuroanatomy, and a subset of behavioral responses. *Curr Biol* **15**, 844-50.

Beales, P. L., Bland, E., Tobin, J. L., Bacchelli, C., Tuysuz, B., Hill, J., Rix, S., Pearson, C. G., Kai, M., Hartley, J. et al. (2007). IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat Genet* **39**, 727-9.

Bessodes, N., Haillot, E., Duboc, V., Rottinger, E., Lahaye, F. and Lepage, T. (2012). Reciprocal signaling between the ectoderm and a mesendodermal left-right organizer directs left-right determination in the sea urchin embryo. *PLoS Genet* **8**, e1003121.

Bianco, I. H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J. D. and Wilson, S. W. (2008). Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. *Neural Dev* **3**, 9.

Bianco, I. H. and Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 1005-20.

Bisazza, A., Cantalupo, C., Capocchiano, M. and Vallortigara, G. (2000). Population lateralisation and social behaviour: a study with 16 species of fish. *Laterality* **5**, 269-84.

Boettger, T., Wittler, L. and Kessel, M. (1999). FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr Biol* **9**, 277-80.

Bohnsack, B. L., Kasprick, D. S., Kish, P. E., Goldman, D. and Kahana, A. (2012). A zebrafish model of axenfeld-rieger syndrome reveals that pitx2 regulation by retinoic acid is essential for ocular and craniofacial development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 7-22.

Brennan, J., Norris, D. P. and Robertson, E. J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev* **16**, 2339-44.

- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., Nakahara, H. and Hikosaka, O.** (2010). Multiple timescales of memory in lateral habenula and dopamine neurons. *Neuron* **67**, 499-510.
- Carl, M., Bianco, I. H., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Czerny, T. and Wilson, S. W.** (2007). Wnt/Axin1/beta-catenin signaling regulates asymmetric nodal activation, elaboration, and concordance of CNS asymmetries. *Neuron* **55**, 393-405.
- Casey, B. and Hackett, B. P.** (2000). Left-right axis malformations in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 257-61.
- Catani, M., Allin, M. P., Husain, M., Pugliese, L., Mesulam, M. M., Murray, R. M. and Jones, D. K.** (2007). Symmetries in human brain language pathways correlate with verbal recall. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17163-8.
- Cau, E., Quillien, A. and Blader, P.** (2008). Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Development* **135**, 2391-401.
- Chang, H., Zwijsen, A., Vogel, H., Huylebroeck, D. and Matzuk, M. M.** (2000). Smad5 is essential for left-right asymmetry in mice. *Dev Biol* **219**, 71-8.
- Chocron, S., Verhoeven, M. C., Rentzsch, F., Hammerschmidt, M. and Bakkers, J.** (2007). Zebrafish Bmp4 regulates left-right asymmetry at two distinct developmental time points. *Dev Biol* **305**, 577-88.
- Choo, B. G., Kondrichin, I., Parinov, S., Emelyanov, A., Go, W., Toh, W. C. and Korzh, V.** (2006). Zebrafish transgenic Enhancer TRAP line database (ZETRAP). *BMC Dev Biol* **6**, 5.
- Christman, S.** (2009). Eclectic lefty-hand: Conjectures on Jimi Hendrix, handedness, and Electric Ladyland. *Laterality* **15**, 253-69.
- Ciani, L. and Salinas, P. C.** (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351-62.
- Clanton, J. A., Hope, K. D. and Gamse, J. T.** (2012). Fgf signaling governs cell fate in the zebrafish pineal complex. *Development* **140**, 323-32.
- Clanton, J. A., Shestopalov, I., Chen, J. K. and Gamse, J. T.** (2011). Lineage labeling of zebrafish cells with laser uncagable fluorescein dextran. *J Vis Exp*.
- Collignon, J., Varlet, I. and Robertson, E. J.** (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* **381**, 155-8.
- Concha, M. L., Burdine, R. D., Russell, C., Schier, A. F. and Wilson, S. W.** (2000). A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* **28**, 399-409.
- Concha, M. L., Russell, C., Regan, J. C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D. T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E. et al.** (2003). Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron* **39**, 423-38.
- Concha, M. L. and Wilson, S. W.** (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat* **199**, 63-84.
- Corballis, M. C.** (2009). The evolution and genetics of cerebral asymmetry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 867-79.
- Dadda, M., Domenichini, A., Piffer, L., Argenton, F. and Bisazza, A.** (2009). Early differences in epithalamic left-right asymmetry influence lateralization and personality of adult zebrafish. *Behav Brain Res* **206**, 208-15.
- Danilova, N., Krupnik, V. E., Sugden, D. and Zhdanova, I. V.** (2004). Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *FASEB J* **18**, 751-3.
- Dathe, V., Gamel, A., Manner, J., Brand-Saberi, B. and Christ, B.** (2002). Morphological left-right asymmetry of Hensen's node precedes the asymmetric expression of Shh and Fgf8 in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* **205**, 343-54.

- de Borsetti, N. H., Dean, B. J., Bain, E. J., Clanton, J. A., Taylor, R. W. and Gamse, J. T.** (2011). Light and melatonin schedule neuronal differentiation in the habenular nuclei. *Dev Biol* **358**, 251-61.
- Diamond, M. C., Johnson, R. E., Young, D. and Singh, S. S.** (1983). Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: male-female; right-left. *Exp Neurol* **81**, 1-13.
- Doll, C. A., Burkart, J. T., Hope, K. D., Halpern, M. E. and Gamse, J. T.** (2011). Subnuclear development of the zebrafish habenular nuclei requires ER translocon function. *Dev Biol* **360**, 44-57.
- Duboc, V., Rottinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L. and Lepage, T.** (2005). Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Dev Cell* **9**, 147-58.
- Dufourcq, P., Rastegar, S., Strahle, U. and Blader, P.** (2004). Parapineal specific expression of *gf11* in the zebrafish epithalamus. *Gene Expr Patterns* **4**, 53-7.
- Escalante-Mead, P. R., Minshew, N. J. and Sweeney, J. A.** (2003). Abnormal brain lateralization in high-functioning autism. *J Autism Dev Disord* **33**, 539-43.
- Essner, J. J., Branford, W. W., Zhang, J. and Yost, H. J.** (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development* **127**, 1081-93.
- Fischer, A., Viebahn, C. and Blum, M.** (2002). FGF8 acts as a right determinant during establishment of the left-right axis in the rabbit. *Curr Biol* **12**, 1807-16.
- Fujiwara, T., Dehart, D. B., Sulik, K. K. and Hogan, B. L.** (2002). Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. *Development* **129**, 4685-96.
- Fukumoto, T., Kema, I. P. and Levin, M.** (2005). Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr Biol* **15**, 794-803.
- Furtado, M. B., Biben, C., Shiratori, H., Hamada, H. and Harvey, R. P.** Characterization of *Pitx2c* expression in the mouse heart using a reporter transgene. *Dev Dyn* **240**, 195-203.
- Gage, P. J., Suh, H. and Camper, S. A.** (1999). Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* **126**, 4643-51.
- Gamse, J. T., Kuan, Y. S., Macurak, M., Brosamle, C., Thisse, B., Thisse, C. and Halpern, M. E.** (2005). Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. *Development* **132**, 4869-81.
- Gamse, J. T., Thisse, C., Thisse, B. and Halpern, M. E.** (2003). The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development* **130**, 1059-68.
- Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Gallouzi, I. E., Rosenfeld, M. G. and Briata, P.** (2009). Akt2-mediated phosphorylation of *Pitx2* controls *Ccnd1* mRNA decay during muscle cell differentiation. *Cell Death Differ* **17**, 975-83.
- Ghirlanda, S. and Vallortigara, G.** (2004). The evolution of brain lateralization: a game-theoretical analysis of population structure. *Proc Biol Sci* **271**, 853-7.
- Gilmour, D. T., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C.** (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* **34**, 577-88.
- Gros, J., Feistel, K., Viebahn, C., Blum, M. and Tabin, C. J.** (2009). Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick. *Science* **324**, 941-4.
- Gunturkun, O.** (1997). Morphological asymmetries of the tectum opticum in the pigeon. *Exp Brain Res* **116**, 561-6.

- Gutierrez-Ibanez, C., Reddon, A. R., Kreuzer, M. B., Wylie, D. R. and Hurd, P. L.** (2011). Variation in asymmetry of the habenular nucleus correlates with behavioural asymmetry in a cichlid fish. *Behav Brain Res* **221**, 189-96.
- Hendricks, M. and Jesuthasan, S.** (2007). Asymmetric innervation of the habenula in zebrafish. *J Comp Neurol* **502**, 611-9.
- Herbert, M. R., Ziegler, D. A., Deutsch, C. K., O'Brien, L. M., Kennedy, D. N., Filipek, P. A., Bakardjiev, A. I., Hodgson, J., Takeoka, M., Makris, N. et al.** (2005). Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: a nested whole-brain analysis. *Brain* **128**, 213-26.
- Hibino, T., Ishii, Y., Levin, M. and Nishino, A.** (2006). Ion flow regulates left-right asymmetry in sea urchin development. *Dev Genes Evol* **216**, 265-76.
- Hoso, M., Asami, T. and Hori, M.** (2007). Right-handed snakes: convergent evolution of asymmetry for functional specialization. *Biol Lett* **3**, 169-72.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. and Hill, C. S.** (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**, 65-74.
- Isaac, A., Sargent, M. G. and Cooke, J.** (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301-4.
- Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., Chandraratna, R. A., Morohashi, K. et al.** (2008). Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* **135**, 677-85.
- Kato, Y.** (2011). The multiple roles of Notch signaling during left-right patterning. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2555-67.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y. et al.** (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periorbital mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* **126**, 5749-58.
- Koshiba, M., Nakamura, S., Deng, C. and Rogers, L. J.** (2003). Light-dependent development of asymmetry in the ipsilateral and contralateral thalamofugal visual projections of the chick. *Neurosci Lett* **336**, 81-4.
- Krebs, L. T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I. C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T. P., Hamada, H. and Gridley, T.** (2003). Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* **17**, 1207-12.
- Kuan, Y. S., Gamse, J. T., Schreiber, A. M. and Halpern, M. E.** (2007). Selective asymmetry in a conserved forebrain to midbrain projection. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **308**, 669-78.
- Lamba, P., Hjalt, T. A. and Bernard, D. J.** (2008). Novel forms of Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2): generation by alternative translation initiation and mRNA splicing. *BMC Mol Biol* **9**, 31.
- Lecourtier, L., Neijt, H. C. and Kelly, P. H.** (2004). Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* **19**, 2551-60.
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B. and Jesuthasan, S.** (2010). The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. *Curr Biol* **20**, 2211-6.
- Lenhart, K. F., Holtzman, N. G., Williams, J. R. and Burdine, R. D.** (2013). Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry. *PLoS Genet* **9**, e1003109.

Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M. and Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-14.

Levin, M., Pagan, S., Roberts, D. J., Cooke, J., Kuehn, M. R. and Tabin, C. J. (1997). Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol* **189**, 57-67.

Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K. R., Nogi, T. and Mercola, M. (2002). Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* **111**, 77-89.

Li, X., Branch, C. A., Ardekani, B. A., Bertisch, H., Hicks, C. and DeLisi, L. E. (2007). fMRI study of language activation in schizophrenia, schizoaffective disorder and in individuals genetically at high risk. *Schizophr Res* **96**, 14-24.

Liang, J. O., Etheridge, A., Hantsoo, L., Rubinstein, A. L., Nowak, S. J., Izpisua Belmonte, J. C. and Halpern, M. E. (2000). Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development* **127**, 5101-12.

Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**, 279-82.

Liu, A. and Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 945-54.

Liu, C., Liu, W., Lu, M. F., Brown, N. A. and Martin, J. F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* **128**, 2039-48.

Liu, C., Liu, W., Palie, J., Lu, M. F., Brown, N. A. and Martin, J. F. (2002). Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. *Development* **129**, 5081-91.

Liu, Y. and Semina, E. V. (2012). pitx2 Deficiency results in abnormal ocular and craniofacial development in zebrafish. *PLoS One* **7**, e30896.

Long, S., Ahmad, N. and Rebagliati, M. (2003). The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* **130**, 2303-16.

Lopes, S. S., Lourenco, R., Pacheco, L., Moreno, N., Kreiling, J. and Saude, L. (2010). Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control. *Development* **137**, 3625-32.

Lowe, L. A., Supp, D. M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C. V., Potter, S. S., Overbeek, P. and Kuehn, M. R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**, 158-61.

Lu, M. F., Pressman, C., Dyer, R., Johnson, R. L. and Martin, J. F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401**, 276-8.

Martinez-Fernandez, S., Hernandez-Torres, F., Franco, D., Lyons, G. E., Navarro, F. and Aranega, A. E. (2006). Pitx2c overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts. *Dev Dyn* **235**, 2930-9.

Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W. (1997). floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.

Mathuru, A. S., Kibat, C., Cheong, W. F., Shui, G., Wenk, M. R., Friedrich, R. W. and Jesuthasan, S. (2012). Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. *Curr Biol* **22**, 538-44.

Matsui, T. and Bessho, Y. (2012). Left-right asymmetry in zebrafish. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3069-77.

McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X. and Brueckner, M. (2003). Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**, 61-73.

- McManus, I. C., Porac, C., Bryden, M. P. and Boucher, R.** (1999). Eye-dominance, writing hand, and throwing hand. *Laterality* **4**, 173-92.
- Meyers, E. N. and Martin, G. R.** (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* **285**, 403-6.
- Miklosi, A. and Andrew, R. J.** (1999). Right eye use associated with decision to bite in zebrafish. *Behav Brain Res* **105**, 199-205.
- Miklosi, A., Andrew, R. J. and Savage, H.** (1997). Behavioural lateralisation of the tetrapod type in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Physiol Behav* **63**, 127-35.
- Mine, N., Anderson, R. M. and Klingensmith, J.** (2008). BMP antagonism is required in both the node and lateral plate mesoderm for mammalian left-right axis establishment. *Development* **135**, 2425-34.
- Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H. and Yoshihara, Y.** (2009). From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci* **29**, 4756-67.
- Monsoro-Burq, A. and Le Douarin, N.** (2000). Left-right asymmetry in BMP4 signalling pathway during chick gastrulation. *Mech Dev* **97**, 105-8.
- Neugebauer, J. M., Amack, J. D., Peterson, A. G., Bisgrove, B. W. and Yost, H. J.** (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* **458**, 651-4.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N.** (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-37.
- Nonaka, S., Yoshida, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S., Goto, T., Marshall, W. F. and Hamada, H.** (2005). De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia. *PLoS Biol* **3**, e268.
- Norris, D. P. and Robertson, E. J.** (1999). Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev* **13**, 1575-88.
- Ogawa, S., Ng, K. W., Ramadasan, P. N., Nathan, F. M. and Parhar, I. S.** (2012). Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. *Endocrinology* **153**, 2398-407.
- Oki, S., Hashimoto, R., Okui, Y., Shen, M. M., Mekada, E., Otani, H., Saijoh, Y. and Hamada, H.** (2007). Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. *Development* **134**, 3893-904.
- Oxtoby, E. and Jowett, T.** (1993). Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* **21**, 1087-95.
- Peeters, H. and Devriendt, K.** (2006). Human laterality disorders. *Eur J Med Genet* **49**, 349-62.
- Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Buscher, D., Koth, C. M., Itoh, T., Morita, M., Raya, R. M., Dubova, I., Bessa, J. G. et al.** (2003). Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. *Genes Dev* **17**, 1213-8.
- Raymond, M., Pontier, D., Dufour, A. B. and Moller, A. P.** (1996). Frequency-dependent maintenance of left handedness in humans. *Proc Biol Sci* **263**, 1627-33.
- Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C. and Wilson, S. W.** (2009). An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry. *Neuron* **61**, 27-34.
- Rodriguez Esteban, C., Capdevila, J., Economides, A. N., Pascual, J., Ortiz, A. and Izpisua Belmonte, J. C.** (1999). The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243-51.

- Rogers, L. J.** (1982). Light experience and asymmetry of brain function in chickens. *Nature* **297**, 223-5.
- Rogers, L. J., Andrew, R. J. and Johnston, A. N.** (2007). Light experience and the development of behavioural lateralization in chicks III. Learning to distinguish pebbles from grains. *Behav Brain Res* **177**, 61-9.
- Rogers, L. J. and Deng, C.** (2005). Corticosterone treatment of the chick embryo affects light-stimulated development of the thalamofugal visual pathway. *Behav Brain Res* **159**, 63-71.
- Roussigne, M., Bianco, I. H., Wilson, S. W. and Blader, P.** (2009). Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development* **136**, 1549-57.
- Roussigne, M., Blader, P. and Wilson, S. W.** (2012). Breaking symmetry: the zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain. *Dev Neurobiol* **72**, 269-81.
- Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S. et al.** (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-51.
- Sagasti, A., Hisamoto, N., Hyodo, J., Tanaka-Hino, M., Matsumoto, K. and Bargmann, C. I.** (2001). The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. *Cell* **105**, 221-32.
- Saijoh, Y., Adachi, H., Sakuma, R., Yeo, C. Y., Yashiro, K., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Kawabata, M. et al.** (2000). Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2. *Mol Cell* **5**, 35-47.
- Sanders, D., Simkiss, D., Braddy, D., Baccus, S., Morton, T., Cannady, R., Weaver, N., Rose, J. E. and Levin, E. D.** (2009). Nicotinic receptors in the habenula: importance for memory. *Neuroscience* **166**, 386-90.
- Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L., Small, K. W., Datson, N. A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B. U. et al.** (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* **14**, 392-9.
- Shen, M. C., Ozacar, A. T., Osgood, M., Boeras, C., Pink, J., Thomas, J., Kohtz, J. D. and Karlstrom, R.** Heat-shock-mediated conditional regulation of hedgehog/gli signaling in zebrafish. *Dev Dyn* **242**, 539-49.
- Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M. and Hamada, H.** (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell* **7**, 137-49.
- Shiratori, H., Yashiro, K., Shen, M. M. and Hamada, H.** (2006). Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* **133**, 3015-25.
- Simard, A., Di Giorgio, L., Amen, M., Westwood, A., Amendt, B. A. and Ryan, A. K.** (2009). The Pitx2c N-terminal domain is a critical interaction domain required for asymmetric morphogenesis. *Dev Dyn* **238**, 2459-70.
- Smith, K. A., Noel, E., Thurlings, I., Rehmann, H., Chocron, S. and Bakkers, J.** (2011). Bmp and nodal independently regulate lefty1 expression to maintain unilateral nodal activity during left-right axis specification in zebrafish. *PLoS Genet* **7**, e1002289.
- Snelson, C. D., Burkart, J. T. and Gamse, J. T.** (2008a). Formation of the asymmetric pineal complex in zebrafish requires two independently acting transcription factors. *Dev Dyn* **237**, 3538-44.

Snelson, C. D., Santhakumar, K., Halpern, M. E. and Gamse, J. T. (2008b). Tbx2b is required for the development of the parapineal organ. *Development* **135**, 1693-702.

Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S. and Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**, 963-6.

Suzuki, H., Thiele, T. R., Faumont, S., Ezcurra, M., Lockery, S. R. and Schafer, W. R. (2008). Functional asymmetry in *Caenorhabditis elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature* **454**, 114-7.

Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H. and Saijoh, Y. (2007). Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes Dev* **21**, 3272-82.

Taylor, R. W., Qi, J. Y., Talaga, A. K., Ma, T. P., Pan, L., Bartholomew, C. R., Klionsky, D. J., Moens, C. B. and Gamse, J. T. (2011). Asymmetric inhibition of Ulk2 causes left-right differences in habenular neuropil formation. *J Neurosci* **31**, 9869-78.

Thisse, C. and Thisse, B. (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**, 229-40.

Tsukui, T., Capdevila, J., Tamura, K., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Magallon, J., Chandraratna, R. A., Chien, K., Blumberg, B. et al. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11376-81.

Vandenberg, L. N., Lemire, J. M. and Levin, M. Serotonin has early, cilia-independent roles in *Xenopus* left-right patterning. *Dis Model Mech* **6**, 261-8.

Vanderlaan, G., Tyurina, O. V., Karlstrom, R. O. and Chandrasekhar, A. (2005). Gli function is essential for motor neuron induction in zebrafish. *Dev Biol* **282**, 550-70.

Vanhoven, M. K., Bauer Huang, S. L., Albin, S. D. and Bargmann, C. I. (2006). The claudin superfamily protein nsy-4 biases lateral signaling to generate left-right asymmetry in *C. elegans* olfactory neurons. *Neuron* **51**, 291-302.

Veerkamp, J., Rudolph, F., Cseresnyes, Z., Priller, F., Otten, C., Renz, M., Schaefer, L. and Abdelilah-Seyfried, S. (2013). Unilateral dampening of Bmp activity by nodal generates cardiac left-right asymmetry. *Dev Cell* **24**, 660-7.

Wade, T. J. (2010). The Relationships between Symmetry and Attractiveness and Mating Relevant Decisions and Behavior: A Review. *Symmetry* **2(2):1081-1098**.

Wan, C. Y., Marchina, S., Norton, A. and Schlaug, G. (2012). Atypical hemispheric asymmetry in the arcuate fasciculus of completely nonverbal children with autism. *Ann N Y Acad Sci* **1252**, 332-7.

Yamauchi, H., Miyakawa, N., Miyake, A. and Itoh, N. (2009). Fgf4 is required for left-right patterning of visceral organs in zebrafish. *Dev Biol* **332**, 177-85.

Yang, L. M., Hu, B., Xia, Y. H., Zhang, B. L. and Zhao, H. (2008). Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res* **188**, 84-90.

Yokouchi, Y., Vogan, K. J., Pearse, R. V., 2nd and Tabin, C. J. (1999). Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**, 573-83.

Yoshida, Y. (2012). Semaphorin signaling in vertebrate neural circuit assembly. *Front Mol Neurosci* **5**, 71.

Zhang, X. M., Ramalho-Santos, M. and McMahon, A. P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* **105**, 781-92.

Rôle de la voie Nodal et du facteur de transcription *pitx2c* dans la mise en place des asymétries neurales dans l'épithalamus du poisson zèbre

Résumé :

Malgré notre apparente symétrie, il existe de nombreuses différences entre nos côtés gauche et droit tant au niveau de nos viscères qu'au niveau de notre cerveau. Ces asymétries neuroanatomiques sous-tendent des asymétries fonctionnelles et comportementales : le langage, par exemple, est un processus principalement réalisé dans l'hémisphère gauche. Des défauts dans la latéralisation (ou orientation droite ou gauche des asymétries) ont été corrélés à des désordres neuropathologiques comme la schizophrénie, l'autisme ou des maladies neurodégénératives. Il semble donc nécessaire d'étudier la mise en place de ces asymétries dans un modèle plus simple pour pouvoir en disséquer les étapes.

Le poisson zèbre émerge depuis plusieurs années comme un modèle de choix pour étudier la mise en place de ces asymétries grâce à une structure asymétrique, l'épithalamus, qui appartient au diencephale. L'épithalamus est constitué des noyaux gauche et droit des habenulae situés de part et d'autre de la ligne médiane et du complexe pinéal, lui même composé de la glande pinéale médiane et de la glande parapinéale. La localisation de la parapinéale pointe une asymétrie flagrante car cette glande est située dans 95% des cas à gauche de l'axe médian. Mais en plus de cette asymétrie neuroanatomique, l'épithalamus comporte une asymétrie moléculaire au niveau des noyaux de l'habenula : l'expression préférentielle dans le noyau droit ou dans le noyau gauche de certains marqueurs comme *kctd12.1/leftover* vont définir des sous domaines au sein de l'habenula. Il s'avère qu'une corrélation parfaite entre la latéralité de la parapinéale et la distribution des sous domaines existe grâce à une communication bidirectionnelle entre parapinéale et habenulae. Par ailleurs, il existe également une asymétrie de neurogenèse entre les noyaux habénulaires. En effet, des neurones apparaissent plus précocement au sein du noyau gauche de l'habenulae.

La voie de signalisation TGF- β /Nodal a été décrite comme coordonnant la mise en place des différentes asymétries présentes dans l'épithalamus du poisson zèbre : l'activité de cette voie dans le territoire gauche de l'épithalamus biaise la migration de la parapinéale vers la gauche et impose l'asymétrie de la neurogenèse. La façon dont Nodal régule latéralité et asymétries dans l'épithalamus reste néanmoins inconnue.

Le projet dans lequel s'inscrit ce projet de thèse vise à révéler les gènes cibles de Nodal qui jouent un rôle dans la mise en place des différentes asymétries de l'épithalamus. *Pitx2c*, facteur de transcription appartenant à la famille des gènes à homéodomains, connu pour être une cible directe de la voie Nodal, est un candidat de choix pour faire le lien entre la voie de signalisation Nodal, neurogenèse asymétrique et latéralité de l'épithalamus. De nombreuses études montrent le rôle essentiel de *pitx2c* dans la latéralité et l'asymétrie de structures viscérales comme le cœur ou les poumons. De plus, il est exprimé dans le territoire gauche de l'épithalamus.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont pu mettre à jour l'implication de *pitx2c* dans la mise en place des asymétries de l'épithalamus ; *Pitx2c* permet d'imposer l'asymétrie de neurogenèse des habenulae. De façon inattendue, *pitx2c* régule également la taille de la glande parapinéale qui est essentielle à l'établissement correct de l'identité des neurones habénulaires.

Summary :

Although we consider ourselves to be symmetric along the left-right axis, our bodies display obvious asymmetries in structure and position of organs; our heart, for instance, is on the left side. Structural differences can also be found in the brain between the left and right hemispheres. These neuroanatomical asymmetries underlie functional and behavioural asymmetries, an example being language that is processed predominantly by the left hemisphere of our brain. Intriguingly, defects in brain lateralisation (the left or right orientation of asymmetries) have been recently correlated to neuropathological disorders such as schizophrenia, autism or neurodegenerative diseases. It seems, thus, that the correct establishment of neuroanatomical asymmetries is essential for a functional nervous system.

In the zebrafish, *Danio rerio*, the establishment of left-right brain asymmetries is being addressed thanks to an asymmetrical brain structure, the epithalamus, which is located in the dorsal diencephalon. The epithalamus is made up of right and left habenular nuclei and the pineal complex, which contains the epiphysis (or pineal gland) and the parapineal gland. Parapineal location is an obvious neuroanatomical asymmetry because in 95% of cases it is located on the left side. Habenular nuclei also display asymmetries at neuroanatomic, cytoarchitectural and molecular levels which are conserved through vertebrate evolution. In the zebrafish, habenula asymmetries can be detected by differential expression of molecular markers, which define left and right nuclei identity. For instance, the *kctd12.1/leftover* gene is preferentially expressed in the left nucleus. An asymmetry in habenular neurogenesis is also present: a pool of neurons appears earlier in the left habenular nuclei. A perfect correlation exists between the laterality (left or right orientation) of the parapineal migration and the distribution of the subdomains markers of habenulae. Studies have showed that this association is established through a stepwise series of interactions between the habenulae and parapineal during development.

The TGF- β /Nodal signaling pathway is a key factor in the establishment of epithalamic asymmetries: its activity in the left epithalamic territory biases the parapineal migration to the left and imposes asymmetry on neurogenesis. How Nodal impose laterality and asymmetries in the epithalamus remains unknown. My PhD project aims to identify Nodal targets genes that are involved in the establishment of asymmetry in the epithalamus. *Pitx2c*, a transcription factor, known to be a Nodal direct target gene, is a good candidate to bridge the gap between Nodal signaling, asymmetrical neurogenesis and laterality. Moreover, *pitx2c* has been shown to be involved in the positioning of organs relative to the midline and in asymmetrical organogenesis.

In this context, my PhD work revealed the implication of *pitx2c* in building an asymmetrical epithalamus: *pitx2c* imposes asymmetric neurogenesis upon the impulsion of Nodal signalling. Unexpectedly, in parallel to its role in habenular neurogenesis, *pitx2c* also controls parapineal size which is crucial for correct acquisition of habenular neuronal identities.

Mots clés : zebrafish, poisson zébre, épithalamus, système nerveux, asymétries, parapinéale, habenulae, Nodal, *pitx2c*